

DANIELLE MALHEIROS FERREIRA

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
LINFÓCITOS T CD4⁺ APLICADA AO ESTUDO DA DOENÇA
AUTOIMUNE PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO**

2009

DANIELLE MALHEIROS FERREIRA

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
LINFÓCITOS T CD4⁺ APLICADA AO ESTUDO DA DOENÇA
AUTOIMUNE PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO**

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Genética, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do Título de Doutora
em Genética.

Orientadora: Prof^a Dra Maria Luiza
Petzl-Erler

2009

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Ferreira, Danielle Malheiros

Análise do perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ aplicada ao estudo da doença autoimune pênfigo foliáceo endêmico. / Danielle Malheiros Ferreira. – Curitiba, 2009.

92 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria Luiza Petzl-Erler

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Pênfigo 2. Genética 3. Células T I. Título II. Petzl-Erler, Maria Luiza III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.978



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética



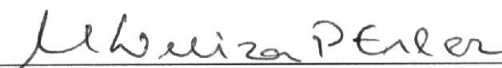
PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado a que se submeteu **DANIELLE MALHEIROS FERREIRA**, para fins de obter o título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

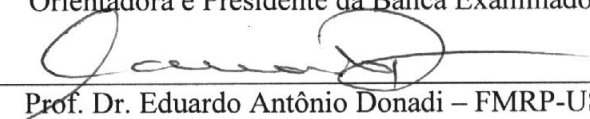
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 19 de fevereiro de 2009

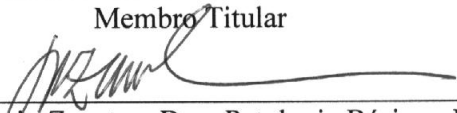
Banca Examinadora:



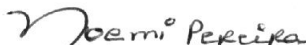
Prof.ª Dr.ª Maria Luiza Petzl-Erler - UFPR
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora



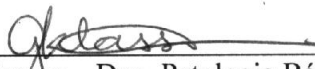
Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi – FMRP-USP
Membro Titular



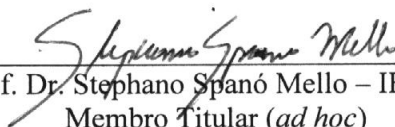
Prof. Dr. Silvio Zanata – Dep. Patologia Básica - UFPR
Membro Titular



Prof.ª Dr.ª Noemi Farah Pereira – HC-UFPR
Membro Titular



Prof.ª Dr.ª Giseli Klassen – Dep. Patologia Básica - UFPR
Membro Titular



Prof. Dr. Stephano Spanó Mello – IB-USP
Membro Titular (*ad hoc*)

Visto:



Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Agradecimentos

À minha orientadora, Maria Luiza, pela confiança, dedicação e ensinamentos desde o início de minhas atividades científicas.

Aos meus pais e todos os meus familiares, pela educação sólida e pelo apoio. Sem vocês eu não estaria hoje nesta etapa da minha vida.

Ao meu namorado, Ives, pela confiança e apoio incondicionais nos momentos difíceis e de saudade, pelo suporte durante os problemas pessoais, pelo amor, carinho e atenção. Obrigada por sempre estar perto, mesmo longe. Você é um dos responsáveis pelo meu êxito.

Pry, só com palavras não consigo expressar todo o meu agradecimento e carinho, por você ter me acolhido na sua casa e tornado meus dias em Ribeirão Preto muito mais agradáveis. Obrigada por estes dois anos de convivência e amizade. Aprendi com você a ser uma pessoa melhor!

Aos Professores Marco Antonio Zago e Rodrigo Panepucci por terem me aceitado no laboratório de Hematologia (USP-RP) permitindo que eu desenvolvesse este trabalho. Panepucci, seus ensinamentos e paciência foram fundamentais!

À Dra Ana Maria Roselino e todos os residentes do Ambulatório de Dermatologia do HC-RP por todo apoio e ajuda com os pacientes. Dra Ana, muito obrigada pelo incentivo e confiança.

A todo o pessoal do Laboratório de Hematologia pela convivência harmoniosa. Amélia, sem sua ajuda, paciência, ensinamentos e bom-humor inabalável seria impossível ter realizado este trabalho. Marli, sua maneira firme de comandar o laboratório é fundamental para manter o alto nível dos trabalhos que são aí são desenvolvidos. Dalvinha, seu jeito meigo e disposição em ajudar em todos os momentos são encantadores. Claudia, Beth e Julia, vocês não imaginam a saudade que sinto das nossas conversas sempre regadas por um bom cafezinho. Sinto muita saudade de todos vocês.

Francisco, companheiro de muitos momentos, sem sua amizade minha estada em Ribeirão Preto teria sido bastante difícil. Obrigada pela amizade, pelas conversas e incentivo nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana – Dan, Ri, Márcia, KB, Liana, Bruno, KK, Gabriel, Áurea, Paloma, Rafael, Layo. Vocês são minha segunda família. Senti muita falta de vocês durante o período que fiquei longe.

Aos amigos do Departamento de Genética, em especial às “Lulus” por tornarem as quartas-feiras tão esperadas!

Aos pacientes e demais voluntários que aceitaram participar deste estudo.

Aos inventores do “Messenger”, “Skype” e afins. Suas invenções possibilitaram que eu me sentisse muito perto das pessoas que gosto, mesmo estando bastante longe.

Levanta, sacode a poeira e dá a volta por cima....

(Paulo Vanzolini)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO (PFE).....	3
2.1.1 Subtipos e Formas Clínicas	3
2.1.2 Epidemiologia.....	4
2.1.3 Imunopatologia.....	5
2.1.4 Histopatologia	6
2.1.5 Tratamento.....	8
2.1.6 Envolvimento de fatores genéticos e ambientais	8
2.2 TOLERÂNCIA E QUEBRA DA TOLERÂNCIA AO PRÓPRIO.....	12
2.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM DISTÚRBIOS IMUNES.....	14
2.4. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺	18
3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. AMOSTRAS	22
4.2. OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4 ⁺	24
4.2.1. Purificação de células por esferas magnéticas.....	24
4.2.2. Citometria de fluxo	24
4.3. OBTENÇÃO DAS BIÓPSIAS	27
4.4. EXTRAÇÃO DO RNA	27
4.5. HIBRIDIZAÇÕES COM OS MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	27
4.6. PCR EM TEMPO REAL.....	29
4.7. ANÁLISE DOS DADOS	29
5. RESULTADOS	31
5.1. GRAU DE PUREZA DOS LINFÓCITOS T CD4 ⁺ OBTIDOS APÓS SEPARAÇÃO MAGNÉTICA	31
5.2. CONTROLE DE QUALIDADE DAS HIBRIDIZAÇÕES.....	31
5.3. AGRUPAMENTO (CLUSTERING) DAS AMOSTRAS	34
5.4. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	34
5.4.1. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sem tratamento imunossupressor em relação aos controles	36
5.4.2. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sob tratamento imunossupressor em comparação aos linfócitos de pacientes sem tratamento	40
5.4.3. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em comparação aos linfócitos de pacientes com a forma localizada	44
5.4.4. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes com pênfigo foliáceo em relação aos controles e compartilhado por pacientes com pênfigo vulgar em relação aos controles ...	48
5.5. VALIDAÇÃO DOS DADOS DOS MICROARRANJOS.....	49
6. DISCUSSÃO.....	61
6.1. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺ DE PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO SEM TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR EM RELAÇÃO AOS CONTROLES.....	61
6.2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺ DE PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO SOB TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR EM COMPARAÇÃO AOS LINFÓCITOS DE PACIENTES SEM TRATAMENTO.....	70

6.3. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LINFÓCITOS T CD4⁺ DE PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO EM COMPARAÇÃO AOS LINFÓCITOS DE PACIENTES COM A FORMA LOCALIZADA DA DOENÇA	73
6.4. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LINFÓCITOS T CD4⁺ DE PACIENTES COM PÊNFIGO FOLIÁCEO E DE PACIENTES COM PÊNFIGO VULGAR	75
6.5. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE OS TECIDOS LESIONADO E NÃO-LESIONADO DE PACIENTES COM PÊNFIGO FOLIÁCEO	76
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
9. ANEXO.....	89

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES ENVOLVIDOS NO ESTUDO.	23
TABELA 2. GENES INDUZIDOS E REPRIMIDOS EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺ DE PACIENTES COM FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO EM RELAÇÃO AOS LINFÓCITOS DE INDIVÍDUOS CONTROLE.	36
TABELA 3. GENES INDUZIDOS E REPRIMIDOS EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺ DE PACIENTES COM FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO SUBMETIDOS A TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR EM RELAÇÃO AOS LINFÓCITOS DE PACIENTES SEM TRATAMENTO.	42
TABELA 4. GENES INDUZIDOS E REPRIMIDOS EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺ DE PACIENTES COM FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO EM RELAÇÃO AOS LINFÓCITOS DE PACIENTES COM A FORMA LOCALIZADA DA DOENÇA.	45
TABELA 5. GENES INDUZIDOS E REPRIMIDOS EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺ DE PACIENTES COM PÊNFIGO FOLIÁCEO E COMPARTILHADOS POR PACIENTES COM PÊNFIGO VULGAR, EM RELAÇÃO AOS LINFÓCITOS DE INDIVÍDUOS CONTROLE.	48
TABELA 6. RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA OBTIDOS POR PCR EM TEMPO REAL E POR MICROARRANJOS PARA OS GENES ANALISADOS EM CADA COMPARAÇÃO.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - LESÕES CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES COM PÊNFIGO FOLIÁCEO	4
FIGURA 2 - MODELO DA VIA IMUNOPATOGÊNICA DO PFE.....	10
FIGURA 3 - IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ APÓS SEPARAÇÃO CELULAR MAGNÉTICA.....	26
FIGURA 4. CONTROLES POSITIVOS NAS HIBRIDIZAÇÕES	32
FIGURA 5. CONTROLES NEGATIVOS NAS HIBRIDIZAÇÕES.....	33
FIGURA 6. AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO DOS DADOS DE MICROARRANJOS DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ EM DIFERENTES SUBGRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES.....	35
FIGURA 7 - GENES ENCONTRADOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO EM RELAÇÃO AOS CONTROLES PARA OS QUAIS JÁ FORAM ENCONTRADAS DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO EM OUTROS DISTÚRBIOS IMUNES..	41
FIGURA 8. GENES ENCONTRADOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO SOB TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR EM RELAÇÃO AOS PACIENTES SEM TRATAMENTO PARA OS QUAIS JÁ FORAM ENCONTRADAS DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO EM OUTROS DISTÚRBIOS IMUNES..	44
FIGURA 9. GENES ENCONTRADOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO EM RELAÇÃO AOS PACIENTES COM A FORMA LOCALIZADA DA DOENÇA PARA OS QUAIS JÁ FORAM ENCONTRADAS DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO EM OUTROS DISTÚRBIOS IMUNES.	47
FIGURA 10. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>CD1D</i>	51
FIGURA 11. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>CX3CR1</i>	51
FIGURA 12. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>CDA</i>	52
FIGURA 13. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>IFI30</i>	52
FIGURA 14. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>LGALS1</i>	53
FIGURA 15. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>LGALS3</i>	53
FIGURA 16. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>GZMA</i>	53
FIGURA 17. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>GZMH</i>	54
FIGURA 18. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>GZMB</i>	54
FIGURA 19. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>LILRB2</i>	55
FIGURA 20. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>TNFSF13B</i>	55
FIGURA 21. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>LYZ</i>	55
FIGURA 22. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO GENE <i>NKG7</i>	56
FIGURA 23. EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>DNAJB1</i>	56
FIGURA 24. EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>CD3G</i>	56
FIGURA 25. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DOS GENES <i>FOXP3</i> , <i>IL10</i> , <i>CTLA4</i> , <i>GATA3</i> , <i>TNFSF18</i> , <i>TGFB1</i> , <i>CXCR4</i> , <i>CD40L</i> E <i>CD40</i> EM BIÓPSIAS DE PELE DE PACIENTES COM PÊNFIGO FOLIÁCEO.....	57
FIGURA 26. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA OBTIDOS POR PCR EM TEMPO REAL E POR MICROARRANJOS.	59

Resumo

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença auto-imune complexa caracterizada por bolhas intra-epidérmicas e pela presença de anticorpos contra a desmogleína 1. A autoimunidade resulta em perda de adesão entre os queratinócitos, um processo denominado acantólise. A etiologia do PF ainda é pouco conhecida. Com o objetivo de identificar alterações moleculares que participem da patogenia da doença utilizou-se a tecnologia de microarranjos de oligonucleotídeos para analisar o perfil de expressão gênica diferencial entre linfócitos T CD4⁺ isolados de sangue periférico de pacientes e controles, e PCR em tempo real para analisar um conjunto de genes de interesse em biópsias de pele de tecido lesionado e não-lesionado de pacientes. Os linfócitos foram purificados em colunas magnéticas e os ensaios foram realizados com microarranjos comerciais que contém sondas representativas do genoma humano total. Várias comparações entre subgrupos de pacientes foram realizadas. Ao comparar-se o perfil de expressão gênica diferencial entre linfócitos de pacientes com a forma generalizada da doença e sem tratamento imunossupressor com linfócitos de indivíduos controles foram identificados 135 genes diferencialmente expressos (122 induzidos e 13 reprimidos nos pacientes). Ao comparar-se o perfil de expressão gênica diferencial entre linfócitos de pacientes com a forma generalizada da doença sem tratamento com linfócitos de pacientes com a forma generalizada sob tratamento imunossupressor 55 genes diferencialmente expressos foram identificados, sendo 41 reprimidos e 14 induzidos nos pacientes sob tratamento. Ao comparar-se o perfil de expressão gênica diferencial entre linfócitos de pacientes com a forma generalizada da doença com linfócitos de pacientes com a forma localizada da doença foram identificados 65 genes diferencialmente expressos (49 induzidos e 16 reprimidos nos pacientes com a forma generalizada). Já ao comparar-se o perfil de expressão gênica diferencial de linfócitos de pacientes com pênfigo foliáceo e pacientes com pênfigo vulgar, uma forma de pênfigo mais grave, em relação aos controles, verificou-se que estas duas doenças compartilham aproximadamente 30% dos genes diferencialmente expressos. Os genes identificados como diferencialmente expressos em todas as comparações são principalmente relacionados com adesão e migração de linfócitos, apoptose, proliferação

celular e apresentação de antígenos. A região cromossômica 19q13 contém o maior número de genes diferencialmente expressos e pode ser considerada uma região candidata a conter genes de susceptibilidade ao PF. Nas biópsias de pele de tecido lesionado e não-lesionado de pacientes, os genes encontrados como diferencialmente expressos são característicos do envolvimento de células T reguladoras, implicando a participação deste tipo celular no controle da doença. Estes resultados adicionam informações originais que contribuem para a compreensão da patogenia do pênfigo foliáceo.

Abstract

Pemphigus foliaceus (PF) is a complex autoimmune disease characterized by skin bullous and presence of antibodies against desmoglein 1. Autoimmunity results in loss of adhesion among keratinocytes (acantholysis). The etiology of PF is poorly understood. Aiming to identify molecular alterations that participate in the pathogenic process of the disease, we used the technology of oligonucleotides microarrays to analyze differential gene expression between T CD4⁺ lymphocytes isolated of peripheral blood of patients and controls, and real time PCR to analyze a set of genes in lesion skin and health skin biopsies of patients. Lymphocytes were purified by magnetic beads and the assays were made with whole genome commercial microarrays. A number of comparisons between subgroups of patients were made. When gene expression was compared between lymphocytes derived from untreated patients carrying the generalized form of the disease with lymphocytes derived from healthy individuals, 135 genes were found to be differentially expressed (122 up-regulated and 13 down-regulated in patients). Comparing gene expression between lymphocytes derived from untreated patients carrying the generalized form of the disease with lymphocytes derived from patients submitted to immunosuppressive treatment, 55 genes were found to be differentially expressed (41 down-regulated and 14 up-regulated in patients submitted to treatment). When gene expression profiles were compared between lymphocytes derived from patients carrying the generalized form of the disease with lymphocytes derived from patients carrying the localized form, 65 genes were differentially expressed (49 up-regulated and 16 down-regulated in patients carrying the generalized form). When lymphocytes of PF patients were compared with those of pemphigus vulgaris patients, approximately 30% of the differentially expressed genes were shared by both diseases. Genes identified like differentially expressed in all comparisons are related with lymphocytes adhesion and migration, apoptosis, cellular proliferation and antigen presentation. Chromosomal region 19q31 contains the greatest number of differentially expressed genes and could be considered a candidate region to have susceptibility genes to PF. Genes found to be differentially expressed between lesion skin and health skin biopsies of patients are characteristic of regulatory T cells, suggesting the participation of this

cellular type on disease control. These results add original information that contributes to the understanding of pemphigus foliaceus pathogenesis.

1. INTRODUÇÃO

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune da epiderme, caracterizada pela presença de autoanticorpos direcionados contra a desmogleína 1, uma glicoproteína de adesão celular, constituinte dos desmossomos. O processo que leva à autoimunidade culmina com a formação de bolhas e desprendimento da camada superficial da epiderme. Ocorrendo de forma endêmica no Brasil (PFE), onde também é conhecido como “fogo selvagem” devido às sensações de ardor e calor, a doença acomete principalmente adultos jovens, vivendo em áreas rurais e, apesar de ocorrer de forma esporádica no mundo inteiro, é no Brasil que o PF atinge sua maior incidência: 25-35 casos por milhão por ano.

Por se tratar de um distúrbio multifatorial, a interação de fatores genéticos e ambientais é crítica para o desenvolvimento da doença. Observações epidemiológicas em nível populacional, bem como estudos de agregação familiar e a busca de genes candidatos têm sido realizados na tentativa de dissecar o componente genético de susceptibilidade ao PFE. Em quase duas décadas de busca intensiva da identificação destes fatores, a etiologia do PFE permanece pouco desconhecida. Os resultados são similares aos encontrados para outras doenças autoimunes: a doença resulta da contribuição de vários genes e alelos que exercem baixo ou moderado efeito fenotípico, sem que nenhum gene candidato seja suficiente ou essencial para que a doença ocorra e a associação mais forte tem sido estabelecida com alelos dos genes do HLA. Além disso, algumas citocinas já foram encontradas em níveis elevados no soro de pacientes quando comparadas ao de controles.

Apesar da grande utilidade da análise de genes candidatos, muitos dos genes importantes para o desenvolvimento da doença não podem ser identificados através dessa abordagem. Isso se deve ao fato de genes candidatos serem escolhidos com base em conhecimento anterior de sua função e polimorfismo e/ou em conhecimento (ao menos parcial) da patogênese da doença. Entretanto, é justamente essa a incógnita: o conhecimento sobre a patogênese da doença e sobre as funções específicas dos genes alterados em sua estrutura ou padrão de expressão é incompleto. A tecnologia de microarranjos para análise de expressão gênica global em nível de RNA possibilita a triagem do transcriptoma em busca de informações que contribuam para o conhecimento das causas e das consequências de doenças.

A tecnologia de microarranjos tem revolucionado pesquisas na área biomédica, em especial aquela direcionada ao estudo de distúrbios complexos, incluindo-se os autoimunes. Não se baseando na existência de variabilidade genética modulando a susceptibilidade, a análise simultânea de expressão de milhares de genes usando microarranjos permite a exploração de interações entre muitos componentes de vias metabólicas diferentes e tem se tornado uma ferramenta importante para reconhecer vias patofisiológicas e identificar alvos terapêuticos direcionados e mais eficazes. Atualmente é possível investigar a expressão de todos os genes humanos com a técnica de microarranjos. Existem argumentos suficientes para considerar as células brancas do sangue periférico e, em particular os linfócitos, um modelo para a investigação de distúrbios do sistema imune no qual a inflamação é um componente importante. Linfócitos expressam mais que 75% do genoma humano e, tendo um papel crítico no desenvolvimento de respostas imunes, eles têm um papel central na patogênese de doenças autoimunes.

Devido à natureza sistêmica das doenças autoimunes e do já evidenciado papel dos linfócitos T CD4⁺ na resposta autoimune característica do PF é que este trabalho se destinou a avaliar as diferenças no perfil de expressão gênica dos linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico de pacientes com os de sangue periférico de controles sadios.

Foram feitas várias comparações com objetivos diferenciais entre subgrupos de pacientes - com a forma generalizada ou localizada da doença, submetidos ou não a tratamento imunossupressor e ainda foram comparados linfócitos de pacientes com a forma generalizada da doença com linfócitos isolados de pacientes com pênfigo vulgar.

A tecnologia de microarranjos até então não havia sido utilizada para se estudar qualquer das formas clínicas de pênfigo, sendo este, portanto, um estudo pioneiro nesta área de pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE)

2.1.1 Subtipos e Formas Clínicas

Pênfigo compreende um grupo de doenças autoimunes raras e graves, órgão-específicas da epiderme, caracterizadas pela produção de autoanticorpos direcionados contra moléculas de adesão celular – as desmogleínas (AMAGAI, 1995a) – expressas sobre os queratinócitos. Tal reconhecimento imune resulta na formação de bolhas intra-epidérmicas.

Existem vários subtipos de pênfigo. Dois dos principais subtipos são o pênfigo foliáceo (PF) e o pênfigo vulgar (PV). Estas formas distinguem-se no que se refere à desmogleína alvo dos autoanticorpos. Na pele, as principais desmogleínas (Dsgs) expressas são a Dsg1 e a Dsg3. A Dsg3 está presente na camada suprabasal (inferior) da epiderme e também nas mucosas. No PV, os autoanticorpos são direcionados contra a Dsg3 e, em muitos casos, também contra a Dsg1. Devido à sua distribuição, as lesões no PV afetam as membranas mucosas com lesões cutâneas aparecendo secundariamente durante o curso da doença. Já a Dsg1 é restrita à camada subcórnea (superior) do epitélio, sendo a desmogleína alvo dos autoanticorpos patogênicos no pênfigo foliáceo (PF). Devido à sua distribuição, as lesões no PF ocorrem estritamente na camada superficial da epiderme (CHIDGEY, 1997).

Há duas principais formas clínicas de pênfigo foliáceo: forma localizada (frustra) e forma generalizada (HANS-FILHO *et al.*, 1999) (Figura 1). Na forma localizada, as lesões em sua maioria, estão limitadas às áreas seborréicas da pele – face, cabeça, pescoço e partes altas do tronco. As lesões são pequenas bolhas que rapidamente se rompem, deixando pequenas áreas erosivas. Após cicatrização completa, na dependência da cor da pele do paciente, podem deixar lesões pigmentadas. Estas lesões podem permanecer estáveis por meses ou regredir espontaneamente. Em alguns pacientes, entretanto, as lesões se espalham pelo tronco e extremidades, progredindo para a forma generalizada do pênfigo foliáceo.

Figura 1 – Lesões características dos pacientes com pênfigo foliáceo.



Figura 1 - Lesões características de pacientes com a forma generalizada (A) e localizada (B) do pênfigo foliáceo. As setas indicam os locais de algumas lesões no paciente com a forma localizada da doença.

Três síndromes clínicas distintas são classificadas como forma generalizada de pênfigo foliáceo. Uma forma bolhosa-esfoliativa, quando os pacientes possuem a doença aguda, intensa, com lesões bolhosas por todo o corpo. Bacteremia ou septicemia não são observados, porém a exposição ao vírus Herpes simplex pode causar o desenvolvimento da erupção variceliforme de Kaposi, uma erupção com risco de letalidade. A segunda forma clínica inclui pacientes que desenvolvem um típico eritoderma esfoliativo. Erosões superficiais confluentes, crostosas e com exsudato sérico também são características. Infecções sobrepostas como dermatofitose, escabiose, verrugas e outras também podem complicar a forma generalizada. A terceira forma clínica inclui pacientes que exibem placas ceratóticas generalizadas e lesões nodulares, similares à da forma crônica localizada da doença (HANS-FILHO *et al.*, 1999).

2.1.2 Epidemiologia

O pênfigo foliáceo pode ser reconhecido sob duas formas: o **não-endêmico**, descrito pela primeira vez em Paris, em 1844, que é raro e ocorre esporadicamente em todo o mundo, e o **endêmico**, também conhecido como *fogo selvagem*, o qual foi registrado pela primeira vez no Brasil, em 1903 e é objeto de estudo deste trabalho. Formas endêmicas de pênfigo foliáceo também foram descritas na Colômbia (ROBLEDO, 1988 *apud* HANS-

FILHO, 1999) e na Tunísia (MORINI, 1993 *apud* HANS-FILHO, 1999). Não há diferenças clínicas e histopatológicas entre os tipos endêmicos e, da mesma forma, entre as formas esporádica e endêmica, sendo que a única característica diferencial entre elas diz respeito à epidemiologia.

Na França, a incidência de pênfigos é de 1,7 casos por milhão por ano. Destes, 73% correspondem ao pênfigo vulgar, a incidência aumenta com a idade, e a proporção sexual de afetados corresponde a 2 mulheres:1 homem. Na Tunísia a incidência é de 6-7 casos por milhão por ano. A maioria dos casos, 61%, corresponde ao pênfigo foliáceo, exibindo a proporção de mulheres para homens afetados de 4:1 e a taxa de incidência sendo maior entre mulheres jovens (BASTUJI-GARIN *et al.*, 1995). No Brasil o PF atinge sua maior incidência: 25-35 casos por milhão por ano. A doença ocorre de forma endêmica nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e, principalmente, Mato Grosso do Sul. Acomete principalmente pessoas que vivem ou viveram em áreas rurais, principalmente nas proximidades de rios e córregos. Frequentemente a doença aparece em crianças e jovens; sendo o pico de incidência entre a segunda e terceira décadas de vida. A proporção sexual de afetados é de 1:1 (DIAZ *et al.*, 1989). Entre os índios Xavantes, em Goiás e Terena, em Mato Grosso do Sul, a prevalência da doença é bastante elevada: 1,4% e 2,6%, respectivamente (HANS-FILHO *et al.*, 1999).

No final da década de 1980, o pênfigo foliáceo brasileiro passou a ser chamado de pênfigo foliáceo endêmico (PFE), refletindo com mais precisão sua principal característica diferencial – a endemicidade. Esta característica torna essa patologia especialmente interessante, sendo a única doença que é ao mesmo tempo autoimune e endêmica (CAMPBELL *et al.*, 2001).

2.1.3 Imunopatologia

A etiologia do PFE permanece desconhecida. A detecção de autoanticorpos circulantes no soro de pacientes foi demonstrada através de imunofluorescência indireta (IFI) (BEUTNER *et al.*, 1964 *apud* CAMPBELL *et al.*, 2001). Os mesmos autores, por meio de imunofluorescência direta (IFD) da pele lesionada de pacientes mostraram a marcação da superfície celular epitelial, indicando a deposição de imunoglobulinas sobre a membrana dos queratinócitos.

Os anticorpos depositados sobre os queratinócitos são principalmente IgG, particularmente da subclasse IgG4, com títulos menores de IgG1, e com IgG2, IgG3 e IgM sendo muito pouco frequentes (TREMEAU-MARTINAGE *et al.*, 1995 *apud* MARTEL *et al.*, 2001a). Os anticorpos circulantes também são IgG4 e IgG1, e raramente IgG3 (JONES *et al.*, 1988 *apud* MARTEL *et al.*, 2001a). A recuperação dos pacientes geralmente está correlacionada com o declínio dos títulos de IgG4, enquanto os títulos de IgG1 muitas vezes permanecem detectáveis, ilustrando o papel patogênico dos anticorpos IgG4 (BHOL *et al.*, 1994 *apud* MARTEL *et al.*, 2001a).

Esses autoanticorpos são direcionados contra a desmogleína 1 (Dsg1), uma glicoproteína transmembrânica, integrante dos desmossomos, e que tem uma participação fundamental na adesão celular entre os queratinócitos (WHEELER *et al.*, 1991). Em conjunto com outros fatores, quando reconhecida pelos autoanticorpos, a Dsg1 perde a capacidade de exercer sua função de adesão celular e, em consequência disso, formam-se as vesículas características da doença com desprendimento da camada superficial da epiderme, fenômeno conhecido como acantólise.

Existem evidências diretas de que autoanticorpos anti-Dsg1 presentes no soro de pacientes são patogênicos. AMAGAI *et al.* (1995b) por meio de experimentos que envolvem imunoadsorção, demonstraram que uma proteína quimérica, contendo o domínio extracelular inteiro da Dsg1, adsorve completamente a imunorreatividade dos anticorpos do soro de pacientes contra a superfície celular dos queratinócitos.

Entretanto, a unicidade das desmogleínas como autoantígenos tem sido questionada. NGUYEN *et al.* (1998) argumentam que autoanticorpos antidesmogleínas sozinhos não são suficientes para desencadear as lesões características dessas doenças, mas que outros autoanticorpos contra outros antígenos da superfície dos queratinócitos são necessários. Esta questão permanece sob investigação e é objeto de intenso debate.

2.1.4 Histopatologia

A característica histológica marcante do PF é a acantólise nas bolhas intra-epidérmicas. No entanto, o mecanismo molecular da acantólise permanece controverso.

Foi sugerido que a ativação do sistema complemento possa ter um papel relevante na acantólise, uma vez que as lesões epidérmicas de pacientes mostram grandes deposições

do fator C3 e porque a adição de complemento às culturas celulares de queratinócitos previamente tratadas com anticorpos IgG de pacientes, intensifica o processo de acantólise (JORDON, 1980; *apud* HANS-FILHO *et al.*, 1999). Entretanto, a acantólise pode ser induzida *in vitro* por anticorpos sozinhos, sem complemento (MARTEL, 2001b). Portanto, parece que o sistema complemento não é necessário para o processo acantolítico, mas provavelmente pode intensificá-lo (DE MESSIAS *et al.*, 1989). A forma como o complemento é ativado permanece incerto. Anticorpos IgG4 não fixam complemento, mas como a doença está frequentemente associada com IgG1, pode ser que ocorra uma ativação local do complemento pela via clássica.

Também foi sugerido que a patogenicidade dos anticorpos no pênfigo se dá pela ativação de proteases não específicas, através do sistema plasminogênio-plasmina. Foi demonstrada a existência de ativador de plasminogênio e atividade proteolítica induzida por autoanticorpos em queratinócitos em cultura. O principal ativador de plasminogênio identificado é do tipo uroquinase (uPA). A uPA ativaria o plasminogênio, que por sua vez induziria a produção de plasmina, uma proteína com atividade proteolítica não-específica, que acabaria quebrando as desmogleínas (XUE *et al.*, 1998). Entretanto, há controvérsias no que se refere à participação de uPA na acantólise e argumentos a favor do bloqueio específico da função das desmogleínas pelos anticorpos IgG: a elevação de uPA foi registrada em muitas doenças de pele sem acantólise e, a transferência passiva de IgG de pacientes para camundongos neonatos *knockout* para uPA induz acantólise no mesmo nível que em camundongos controle (MAHONEY *et al.*, 1999). Portanto, o sistema plasminogênio-plasmina parece também não ter um papel importante na acantólise, mas pode atuar secundariamente na amplificação das lesões.

Recentemente, foi sido sugerido um possível papel da apoptose na indução do pênfigo. Vários estudos mostram que um desbalanço nas moléculas relacionadas à apoptose (como o receptor Fas e seu ligante FasL, caspases, p63 e outras) levam à desregulação da apoptose em pacientes com pênfigo (PUVIANI *et al.* 2003; WANG *et al.*, 2004; ZUCOLOTTO *et al.*, 2003). Estes estudos mostraram que as lesões contém queratinócitos apoptóticos e que a morte celular é induzida no tecido lesionado aparentemente antes da separação celular. Com base nestes resultados, os pesquisadores sugerem que a apoptose pode ser a causa do fenômeno acantolítico, ou seja, que a

acantólise induzida por anticorpos é procedente da via de sinalização de morte celular. Outra proposta é a de que a desregulação na apoptose seja por aumento da morte celular programada normal dos queratinócitos e/ou “limpeza” deficiente ou inadequada do material apoptótico pode deixar como produtos vários antígenos (especificamente, desmogleína) com consequente produção de autoanticorpos (WOLF *et al.*, 2005).

2.1.5 Tratamento

O tratamento do PF é feito, principalmente, com corticóides sistêmicos administrados por via oral. Por demandar um tratamento prolongado, há probabilidade de efeitos colaterais, como o desenvolvimento de infestações intestinais e infecções bacterianas extracutâneas, como pneumonias, infecções urinárias, tuberculose, septicemias e outras. Além disso, podem ocorrer hipertensão, hiperglicemia, aumento de peso, osteoporose, gastrite e úlcera gastrintestinal e surtos psicóticos. Os pacientes devem ainda proteger-se da luz solar, uma vez que a radiação ultravioleta pode induzir a formação de bolhas, sendo o sol um fator ambiental dos mais importantes no desenvolvimento e agravamento do PFE (CAMPBELL *et al.*, 2001).

2.1.6 Envolvimento de fatores genéticos e ambientais

De acordo com o modelo multifatorial no qual se insere o PFE, as doenças complexas não são atribuíveis a um único gene ou a um único fator ambiental.

Com relação aos fatores ambientais, WARREN *et al.* (2000) sugerem que um fator desencadeador da doença está concentrado na área endêmica, pois verificaram que os títulos de anticorpos anti-Dsg1 em indivíduos saudáveis elevam-se com o aumento da proximidade da residência dessas pessoas com a área endêmica de Limão Verde, na qual vivem os indígenas Terena.

Há evidências de que um mosquito, mais especificamente um simulídeo (família Simuliidae), possa atuar como agente transmissor (possivelmente um vírus ou bactéria) ou desencadeador (possivelmente uma proteína salivar) da resposta autoimune (LOMBARDI *et al.*, 1992). Recentemente, LI *et al.* (2003) mostraram que um número significativo de

pacientes com doenças transmitidas por vetores hematófagos como oncocercose, leishmaniose e doença de Chagas, possuem autoanticorpos contra epítomos do quinto domínio extracelular (EC5) da Dsg1 e levantaram a hipótese de que antígeno(s) salivar(es) desses insetos podem conter uma molécula que reage de forma cruzada com a Dsg1 e desencadeia a resposta de anticorpos anti-EC5. De acordo com o modelo proposto, estes pacientes, assim como os pacientes com PFE em estágio pré-clínico, desenvolvem uma resposta inicial de anticorpos não-patogênica contra o EC5 da Dsg1. Esta região, que é muito pequena e próxima à membrana, pode ser críptica, ou seja, o EC5 pode ser sequestrado *in vivo* e consequentemente, é incapaz de ser reconhecido por anticorpos circulantes anti-EC5. Isto explica porque pacientes com oncocercose, leishmaniose e doença de Chagas não têm pênfigo, apesar de possuírem anti-EC5. Já os pacientes que desenvolvem PF seriam indivíduos geneticamente predispostos que, através do fenômeno de "espalhamento intramolecular de epítomos", produziram anticorpos patogênicos contra os primeiro (EC1) e segundo (EC2) domínios extracelulares da Dsg1 (Figura 2). O espalhamento de epítomos é definido como uma resposta autorreativa específica de célula B ou T contra epítomos endógenos, que são distintos dos epítomos desencadeadores da doença, não sendo devido a reações cruzadas de anticorpos. Estes epítomos podem ser derivados da proteína reconhecida inicialmente ou derivar de proteínas secundárias, liberados durante uma resposta inflamatória ou autoimunidade crônica.

Os domínios EC1 e EC2 são os responsáveis pela função de adesão das desmogleínas e quando reconhecidos pelos autoanticorpos podem perder a capacidade de mediar adesão celular e a doença é desencadeada. Este modelo também pode explicar porque muitos indivíduos saudáveis e parentes consanguíneos de pacientes possuem anticorpos anti-Dsg1 e não desenvolvem a doença, pois os anticorpos dos indivíduos livres de PFE são dirigidos contra epítomos do domínio EC5.

Já a participação de um componente genético na patogênese do PFE é evidenciada pela agregação familiar da doença e pelos resultados dos estudos de associação entre a doença e alelos de genes candidatos. Poder-se-ia inferir que a agregação é consequência do compartilhamento do mesmo ambiente entre indivíduos da mesma família. No entanto, o número de casos entre indivíduos geneticamente relacionados é muito superior ao de indivíduos com ligações apenas sociais (esposo-esposa, cunhados etc.). Esta

desproporcionalidade dos índices indica a existência de uma predisposição genética a esta doença (HANS-FILHO *et al.*, 1999).

Figura 2 - Modelo da via imunopatogênica do PFE.

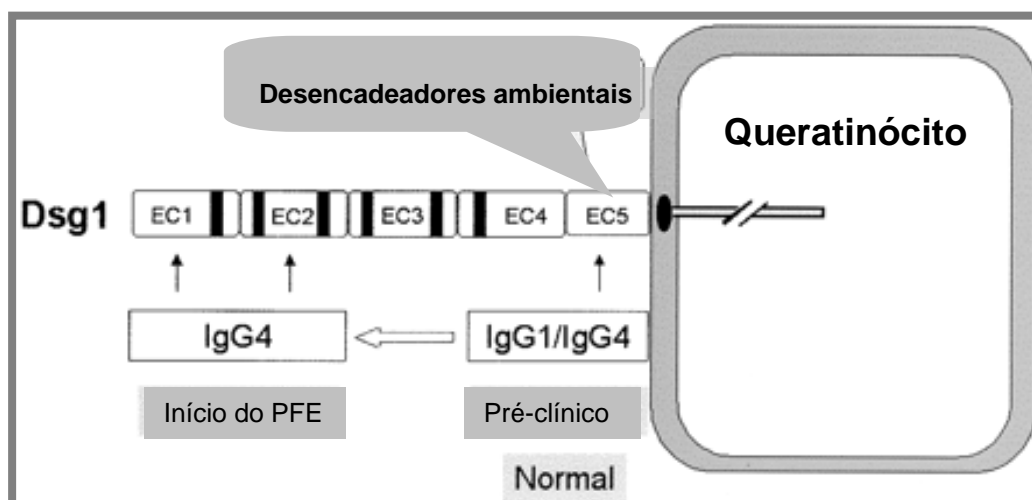


Figura 2 - Modelo da via imunopatogênica do PFE. Fatores ambientais desencadeiam a produção de anticorpos IgG1 e IgG 4 não-patogênicos contra o domínio EC5 da Dsg1. Em indivíduos geneticamente predispostos, o espalhamento intramolecular de epítomos resulta na geração de anticorpos IgG4 contra os domínios EC1 e EC2, o que induz a doença (Li *et al.*, 2003).

Em virtude de sua função na resposta imune e do elevado grau de polimorfismo, vários dos genes situados no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), chamados de genes HLA em humanos, estão entre os mais investigados para associação com doenças autoimunes, incluindo-se o PF. A associação de moléculas HLA com doenças autoimunes é interpretada em função de que os aminoácidos polimórficos no sítio de ligação aos peptídeos definem a afinidade da ligação do peptídeo que está sendo apresentado e, portanto, a capacidade de um indivíduo montar uma resposta imune a um antígeno, sendo ele estranho ou próprio (TODD, 1999).

Num estudo pioneiro, PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989) investigaram, por meio de tipagem sorológica, uma população caucasóide do sul do Brasil, com objetivo de verificar se genes HLA estavam associados à susceptibilidade ao PFE. Foi constatada associação primária positiva com HLA DR1 e DR4, e associação primária negativa com

DQ2. Estes resultados foram recentemente confirmados e ampliados através de tipagem molecular (PAVONI *et al.*, 2003), num estudo que objetivou avaliar as associações entre PFE e alelos *HLA-DRB1*. Outros grupos, trabalhando tanto com o pênfigo foliáceo endêmico (MORAES *et al.*, 1991; MORAES *et al.*, 1997), quanto com a forma esporádica (MIYAGAWA *et al.*, 1999; LOISEAU *et al.*, 2000), encontraram resultados semelhantes. As discordâncias nos resultados das associações são resultantes de diferenças do polimorfismo HLA entre as populações analisadas, já que associações não detectadas em um certo grupo étnico podem ser explicadas pela ausência ou baixa frequência dos alelos correspondentes nesta população (PAVONI *et al.*, 2003). É isto, por exemplo, que ocorre nas populações ameríndias analisadas (MORAES *et al.*, 1997; CERNA *et al.*, 1993), nas quais um padrão diferente de associações foi registrado.

Apesar das discrepâncias nos resultados das associações, foi verificado que alelos *HLA-DRB1*, positivamente associados com PFE em diferentes grupos étnicos, compartilham uma sequência de aminoácidos nas posições 67-74, localizada na terceira região hipervariável da molécula: LLEQRRRAA (MORAES *et al.*, 1997). Estes dados levaram estes pesquisadores a propor que esta sequência é que está envolvida na susceptibilidade ao PFE, e não alelos em particular. No trabalho de PAVONI *et al.* (2003) esse motivo também foi positivamente associado com o PFE. Entretanto, alelos que não têm esse motivo também estão associados com a doença, sugerindo que outras particularidades das moléculas HLA possam ser importantes no reconhecimento do antígeno.

Foram encontradas associações de variantes genéticas de interleucina 6 (*IL6*), interleucina 4 (*IL4*) (PEREIRA *et al.*, 2003), morte celular programada 1 (*PDCD1*) (BRAUN-PRADO E PETZL-ERLER, 2007), *CD40*, *CD40L* e *BLYS* (MALHEIROS E PETZL-ERLER, manuscrito submetido) com o PFE. Associações não foram encontradas com fator de necrose tumoral (*TNF*), linfotoxina alfa (*LTA*) (Roxo *et al.*, 2003), antígeno 4 de linfócito T citotóxico (*CTLA4*) (PAVONI *et al.*, 2006), *BAX* e *TP53* (KOHLER E PETZL-ERLER, 2006) e desmogleína 1 (*DSG1*) (PETZL-ERLER E MALHEIROS, 2005).

2.2 Tolerância e quebra da tolerância ao próprio

Muitos dos indivíduos expostos aos agentes desencadeadores ambientais exógenos não desenvolvem doenças autoimunes. Uma explicação para esta resistência é que muitas dessas pessoas possuem um complemento de alelos em genes imunorreguladores que minimizam o risco que as respostas de células T e B a antígenos próprios ocorram (TODD, 1999). O principal mecanismo responsável pela ausência de reação imunológica contra antígenos próprios é a deleção clonal de células T autorreativas no timo. Até a década de 1960, supunha-se que todos os linfócitos reativos ao próprio fossem eliminados durante seu desenvolvimento e que uma falha na eliminação desses linfócitos levaria à autoimunidade. No final dos anos 1970, muitos pesquisadores mostraram que nem todos os linfócitos reativos ao próprio são eliminados durante a maturação (KUBY, 2002), ou porque a afinidade com o antígeno é baixa (e este não está presente no timo em quantidades suficientes), ou porque o antígeno não estava presente durante a ontogenia das células T (proteínas restritas a determinados órgãos, ditas "sequestradas") (JANEWAY e TRAVERS, 1997). As células que escapam da deleção passam a integrar o conjunto de células T periféricas. Portanto, indivíduos saudáveis possuem linfócitos autorreativos, ou seja, a autoimunidade pode ser considerada uma condição fisiológica.

A presença dessas células autorreativas, via de regra, não resulta em autoimunidade patológica, pois sua atividade pode ser regulada por mecanismos periféricos. Entre estes estão a anergia e a supressão clonal (KUBY, 2002). Vários mecanismos podem resultar na supressão da resposta dessas células, entre eles estão a ação de células supressoras e a baixa afinidade das células T autorreativas em relação ao autoantígeno. Já a anergia é consequência da ausência ou redução de um sinal coestimulador necessário à ativação das células T e B em adição ao fornecido pela ligação entre o receptor de linfócito T (TCR) e o complexo peptídeo/MHC, e o do receptor de linfócitos B (BCR) e o antígeno, respectivamente (JANEWAY e TRAVERS, 1997). Uma quebra nesta regulação pode levar à ativação de clones de células B ou T autorreativos.

A ativação dos clones autorreativos pode ocorrer por várias causas e quase sempre está associada a uma infecção por microrganismos. A liberação de antígenos em

decorrência de uma infecção ou trauma, antes restritos a um determinado local do organismo e que, a princípio, não tinham contato com células do sistema imune (antígenos sequestrados), pode levar à ativação de linfócitos B ou T que escaparam da deleção clonal por não terem interagido anteriormente com esses autoantígenos (KUBY, 2002).

Microrganismos infecciosos podem ativar clones de linfócitos T autorreativos por possuírem antígenos muito semelhantes a autoantígenos, levando a uma reação cruzada. Este fenômeno é conhecido como mimetismo molecular e já foi verificado na esclerose múltipla (WUCHERPFENNIG e STROMINGER, 1995). Os receptores de células T podem reconhecer um número surpreendente de peptídeos estruturalmente relacionados derivados de diferentes antígenos e ligados a moléculas MHC próprias. Esta ampla diversidade do reconhecimento por células T favorece a ocorrência de mimetismo molecular. A existência de um repertório tão diverso faz sentido dentro do contexto de resistência a doenças infecciosas: se o repertório for muito reduzido no timo ou demasiadamente controlado na periferia, pode não haver diversidade adequada para o reconhecimento de antígenos estranhos (TODD, 1999).

Com relação ao pênfigo foliáceo, demonstrou-se a presença de autoanticorpos em uma grande percentagem (55%) de indivíduos saudáveis nas áreas endêmicas (WARREN *et al.*, 2000). A origem desses autoanticorpos pode, em teoria, ser precedida pela apresentação de antígenos próprios, levando à ativação de células T, seguida pela ativação de células B e subsequente produção de anticorpos. Nesses indivíduos, parece que os mecanismos responsáveis pela auto-tolerância estão sendo eficazes, ao contrário dos pacientes nos quais falhas nesse processo permitem o desenvolvimento da autoimunidade patológica. Como mencionado anteriormente, LOMBARDI *et al.* (1992) e LI *et al.* (2003) sugerem que um mosquito possa atuar como agente transmissor ou desencadeador da resposta autoimune no PFE. A exposição crônica aos antígenos inoculados por esses mosquitos poderia ativar a produção de autoanticorpos em indivíduos predispostos, e estes autoanticorpos poderiam reagir de maneira cruzada com antígenos epidérmicos e causar a acantólise.

2.3. Análise de expressão gênica diferencial em distúrbios imunes

Os perfis de expressão gênica refletem a resposta transcricional de centenas de genes a uma mudança no estado celular ou em resposta a um estímulo farmacológico. O objetivo típico de tais experimentos é a identificação de novos genes envolvidos em uma resposta, ou marcadores diagnósticos e/ou prognósticos que caracterizem o estado de doença. Tal abordagem permite uma investigação de grandes porções do genoma em um único ensaio, sem a necessidade de selecionar genes importantes *a priori*. Devido a este potencial de descobrir novos genes de expressão alterada para os quais pouco ou nenhuma informação anterior está disponível que justificasse um papel na doença, experimentos com microarranjos podem ser considerados como geradores de hipóteses mais que dirigidos por hipóteses (KURELLA *et al.*, 2001).

Genes expressos preferencialmente em doenças inflamatórias tais como doença inflamatória intestinal e artrite reumatóide (AR), foram identificados usando microarranjos (HELLER *et al.*, 1997). Além de identificar genes conhecidos, o uso de microarranjos permitiu aos pesquisadores identificar vários genes novos que são expressos nessas condições inflamatórias. Além disso, é frequente o encontro de genes que sabidamente são importantes num contexto não relacionado e, inesperadamente, estão envolvidos no processo que está sendo estudado. Ainda, uma análise mais detalhada do tecido sinovial de pacientes com AR sobre um arranjo de DNAC com 24 mil sequências sugere uma subclassificação em pelo menos dois grupos molecularmente definidos de AR, um com inflamação intensa e ativação de células B e T e outro com pouca inflamação mas com processos de remodelamento tecidual, incluindo a expressão de diferentes tipos de colágeno (van der POUW KRAAN *et al.*, 2003).

A utilização de microarranjos para estudar o lúpus eritematoso sistêmico (LES) levou recentemente à identificação de perfis de expressão gênica que distinguem a maioria dos pacientes dos controles (BAECHLER *et al.*, 2003). Foram examinadas células mononucleares do sangue periférico de 48 pacientes e 42 controles sadios usando arranjos de oligonucleotídeos. Foi identificado um subconjunto de pacientes com expressão desregulada de genes integrantes da via do interferon (IFN). Este registro de IFN foi associado com uma forma mais grave da doença, envolvendo complicações relacionadas à

inflamação dos rins e/ou sistema nervoso central. Dessa maneira, alvos terapêuticos participando da via do IFN podem ser particularmente benéficos no subconjunto de pacientes com doença mais grave.

O mecanismo básico que contribui para a doença autoimune pode, em parte, ser compartilhado entre fenótipos relacionados. Esta é a idéia que se tem a respeito da síndrome de Sjögren (SS) e doenças relacionadas tais como LES e AR. SS é uma doença crônica que pode ocorrer como fenótipo primário ou como síndrome secundária quando presente no contexto de uma doença autoimune adicional. É caracterizada por infiltração linfocítica nas glândulas salivares e lacrimais, levando ao ressecamento dos olhos e boca. Características imunológicas da doença que são sobrepostas entre SS, LES e AR incluem produção de anticorpos anti-Ro/SSA e/ou anti-La/SSB produzidos por muitos pacientes com LES ou SS, e a produção de anticorpos fator reumatóide, os quais são frequentemente encontrados em pacientes com AR ou SS. Estudos de SS utilizando microarranjos mostraram que genes induzíveis por interferons têm expressão aumentada em pacientes comparados com indivíduos controle. Assim, ambas SS e LES compartilham um mecanismo etiológico comum relacionado à desregulação de genes envolvidos na via do IFN. Aplicações adicionais das análises com microarranjos poderiam facilitar a identificação de ambas as vias que são comuns para SS e LES, bem como as vias que são únicas e distinguem pacientes com estas duas doenças (MOSER *et al.*, 2004).

Estudos comparando o perfil de expressão gênica entre pacientes com LES, AR, diabetes tipo 1 e ES também demonstram que perfis de expressão aberrantes podem ser similares entre doenças autoimunes clinicamente distintas (MAAS *et al.*, 2002). Usando microarranjo de DNAC com aproximadamente 4 mil genes, os pesquisadores inicialmente mensuraram a expressão gênica em nove controles sadios antes e após imunização com vacina da influenza, e definiram perfis associados com a resposta imune normal. Comparações entre o perfil de resposta imune normal e autoimune indicaram que padrões de expressão gênica entre pacientes com AR e LES, e EM e diabetes tipo 1 são relativamente similares. Genes que estão induzidos em todas as quatro doenças representam vários receptores, mediadores inflamatórios, moléculas sinalizadoras/segundos mensageiros, e autoantígenos. Muitos dos genes pouco expressos estão envolvidos em apoptose e função de ubiquitinação/proteassomo e são inibidores da progressão do ciclo

celular. Este estudo é particularmente interessante porque demonstra que genes com um padrão de expressão distinto na autoimunidade são conservados entre as diferentes doenças, mas não são todos genes de “resposta imune”.

Dentre as doenças da epiderme, a psoríase tem sido a mais estudada com microarranjos. A psoríase é uma doença inflamatória caracterizada por eritema, endurecimento e formação de escamas na pele. BOWCOCK *et al.* (2001) utilizaram microarranjos para iniciar uma análise mais abrangente da mudança transcricional que ocorre na pele com lesão e sem lesão de pacientes psoriáticos versus indivíduos controles sadios. Distâncias entre amostras, calculadas com base nos níveis de expressão de todos os genes sobre o arranjo, diferenciaram claramente a pele lesionada da não-lesionada e de amostras normais. Para identificar genes diferencialmente expressos foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico. Esta identifica agrupamentos de genes com padrões de expressão similar em amostras individuais e resultou na identificação de 177 transcritos com expressão alterada em psoríase. Cento e sessenta e um destes foram induzidos e menos que um quinto destes tinha sido descrito anteriormente como envolvidos na psoríase. Dez genes também se encontravam induzidos na pele não envolvida. Vários destes genes localizam-se em regiões genômicas ligadas previamente à psoríase e /ou outras doenças autoimunes.

Os estudos que envolvem linfócitos isolados de sangue periférico para análise de expressão gênica, ainda são em pequeno número.

HIJNEN *et al.* (2005) isolaram linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico de pacientes com dermatite atópica e de controles e apesar de não encontrarem expressão aumentada de genes tipicamente expressos por linfócitos Th2, a qual é resposta característica da dermatite atópica, demonstraram que genes diferencialmente expressos estão envolvidos com migração, proliferação celular e apoptose, podendo ser importantes vias modulando a patogênese da doença.

HANSEL *et al.* (2005) também analisaram expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ isolados do sangue periférico de controles e pacientes com asma através de microarranjos. Foi demonstrado que os genes com expressão aumentada incluíam genes envolvidos em ativação de células T, proliferação e mudanças no citoesqueleto e sugeriram que estes representam alvos moleculares em potencial para terapia e prevenção da asma.

Ao analisarem o perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ isolados do sangue periférico de crianças com dificuldades respiratórias persistentes e transitórias, KAPITEIN *et al.* (2008) encontraram genes diferencialmente expressos em vias imunológicas envolvidas em apoptose e proliferação de linfócitos T. Estes pesquisadores mostraram que perfis de expressão gênica são compartilhados pelos diferentes fenótipos de pacientes (com complicações respiratórias persistentes ou transitórias), mas também mostraram a heterogeneidade dos fenótipos é, em parte, refletida pelo perfil de expressão gênica dos linfócitos periféricos, contribuindo, desta maneira, para o entendimento da patofisiologia das complicações respiratórias.

Resultados muito interessantes a respeito de como o tratamento imunossupressor modula a função de linfócitos T foram obtidos por PEREIRA *et al.* (2004). Estes pesquisadores isolaram linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e controles e observaram que pacientes não tratados têm 38 genes reprimidos quando comparados aos controles. Quando pacientes não tratados foram comparados aos tratados, 154 genes foram induzidos. Já BAIÃO *et al.* (2007) ao analisarem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em cultivo tratados com ciclosporina A (CsA), uma droga imunossupressora, identificaram vários genes alvo da CsA, contribuindo para o entendimento do efeito biológico da CsA sobre a expressão gênica em PBMC.

BOMPRESZI *et al.* (2003) obtiveram resultados muito interessantes a respeito do mecanismo patogênico subjacente ao estágio da esclerose múltipla, ao estudarem a diferença do perfil de expressão de células mononucleares do sangue periférico entre pacientes e controles. Apesar de não ser possível entender a consequência biológica de todas as vias que estão alteradas e de que forma elas estariam interagindo, foi verificado que as diferenças existentes entre pacientes e controles compreendem genes relacionados ao sistema imune, como o esperado, mas também genes relacionados ao ciclo celular, sustentando a idéia de que além de ativação de linfócitos e interação célula-célula, outros eventos têm papéis relevantes durante o processo autoimune. Estudos análogos encontraram resultados semelhantes (MAAS *et al.*, 2002; RAMANATHAN *et al.*, 2001).

2.4. Importância do estudo de linfócitos T CD4⁺

Na epiderme lesionada obtém-se *in loco* as células efetoras do processo autoimune. Seria de grande valia para o entendimento da patofisiologia da doença analisar-se estas células. A dificuldade técnica em obter-se populações celulares íntegras de tecido epidérmico é considerável devido à forte adesão entre os diferentes tipos celulares. Além disso, a quantidade de células obtidas é pequena e insuficiente para a maioria dos estudos de expressão gênica. Entretanto, devido à natureza sistêmica das doenças autoimunes têm se verificado que mudanças de expressão gênica clinicamente relevantes também podem ser observadas em células do sangue periférico.

Uma dificuldade particular na aplicação de metodologias de análise de expressão gênica no estudo de tecidos é a grande diversidade de tipos celulares que os compõem e estão envolvidos no processo autoimune. Tanto o tecido patologicamente alterado quanto o normal são inerentemente complexos. O principal problema é que as amostras de tecido podem ter números diferentes de cada tipo celular e diferenças no perfil de expressão podem refletir essa composição diferencial e, portanto, levar a resultados espúrios. Além disso, é difícil identificar em qual população celular as alterações estão ocorrendo, uma vez que diferentes tipos celulares podem expressar os mesmos produtos. Para compreender a intrincada patofisiologia molecular do processo autoimune é mais relevante estudar o perfil de expressão gênica de cada um dos tipos celulares separadamente.

Devido à inviabilidade de se estudar todos os tipos celulares, escolheu-se uma população celular que tem um papel central em respostas imunes e autoimunes – linfócitos T CD4⁺.

A importância dos linfócitos T tem sido demonstrada para várias doenças autoimunes. No PF, está bem definido o papel da imunidade humoral, por meio de anticorpos IgG4 contra a Dsg1. Em geral, a produção de anticorpos por células B requer a colaboração de células T CD4⁺. Como o *fogo selvagem* é uma doença autoimune mediada por anticorpos é esperado que células T também participem da patogênese desta doença. As primeiras evidências desta participação vieram dos estudos de associação com os genes do complexo principal de histocompatibilidade demonstrando a influência do genótipo HLA de classe II na modulação da susceptibilidade individual a essa doença, como descrito

anteriormente. Recentemente, num estudo realizado com os indígenas Terena, LIN *et al.* (2000) demonstraram que linfócitos T do sangue periférico da grande maioria dos pacientes reconhecem e proliferam especificamente em resposta ao domínio extracelular da Dsg1 recombinante. As células T reativas à Dsg1 exibiram um fenótipo de células T CD4⁺ de memória e produziram um perfil de citocinas característico de células Th2, ou seja, produziram IL4, IL5 e IL6, mas não produziram IFN- γ . Os resultados do estudo forneceram sustentação à hipótese de que células T desempenham um importante papel na resposta autoimune característica do PF.

Com relação à reação inflamatória do PFE, foi demonstrada a predominância de linfócitos CD4⁺ tanto na pele lesionada quanto na pele perilesionada em ambas as formas clínicas da doença (localizada e generalizada) (SANTI e SOTTO, 2001).

Sendo assim, os estudos indicam que os linfócitos T CD4⁺ tanto do sangue periférico como do tecido lesionado têm papel central no processo patogênico do PFE.

3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Os trabalhos citados anteriormente demonstram a utilidade da tecnologia de microarranjos no auxílio à compreensão da patogênese molecular subjacente ao desenvolvimento de doenças complexas. Em virtude deste potencial é que este trabalho se destinou a avaliar o perfil de expressão gênica de vários subgrupos de pacientes com pênfigo. Devido à natureza sistêmica das doenças autoimunes e do já evidenciado papel dos linfócitos T CD4⁺ na resposta autoimune característica do PF é que este tipo celular foi escolhido para ser analisado. A etiologia e patofisiologia molecular que culminam com o desenvolvimento do PFE ainda são pouco conhecidas, assim como as alterações moleculares que diferenciam a intensidade das respostas imunológicas em subgrupos de pacientes que manifestam as formas localizada e generalizada da doença. A terapia imunossupressora para tratamento do pênfigo é pouco específica e com efeitos colaterais dos mais diversos. O mecanismo básico que contribui para a autoimunidade pode, em parte, ser compartilhado entre fenótipos relacionados. Portanto, o potencial da análise de expressão gênica diferencial em gerar informações de relevância científica e clínica ao ser aplicado no estudo do pênfigo foliáceo é considerável.

De acordo com o exposto, os objetivos deste trabalho são:

Específicos:

- I. Avaliar o perfil de expressão gênica diferencial em linfócitos T CD4⁺ isolados do sangue periférico de pacientes com pênfigo foliáceo sem tratamento em comparação com indivíduos controles;
- II. Avaliar o perfil de expressão gênica diferencial em linfócitos T CD4⁺ isolados do sangue periférico de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sob tratamento imunossupressor em comparação aos pacientes sem tratamento;
- III. Identificar alterações moleculares que diferenciam a intensidade das respostas imunológicas em subgrupos de pacientes que manifestam as formas localizada ou generalizada do PF e que sejam subjacentes aos linfócitos T CD4⁺;

- IV. Identificar o perfil de expressão gênica de linfócitos CD4⁺ de pacientes com pênfigo foliáceo e de pacientes com pênfigo vulgar para verificar se há uma base molecular comum entre as duas doenças;
- V. Avaliar a expressão dos genes encontrados como diferencialmente expressos nos linfócitos T CD4⁺ periféricos em biópsias de pele de tecido lesionado e não-lesionado de pacientes com pênfigo foliáceo;
- VI. Avaliar, nas biópsias de tecido lesionado e não-lesionado de pacientes com pênfigo foliáceo, a expressão de genes que nos permitem verificar se células T reguladoras estão participando da resposta imune local;

Gerais:

- VII. Obter informações que auxiliem a compreensão da patofisiologia molecular do PFE;
- VIII. Identificar potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de terapias mais efetivas e específicas;
- IX. Contribuir para a compreensão do mecanismo geral que leva à autoimunidade, uma vez que este mecanismo pode ser compartilhado por várias doenças autoimunes clinicamente distintas;
- X. Identificar novos genes candidatos para futuros estudos de associação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Vinte e sete pacientes e nove indivíduos controles sadios foram incluídos no presente estudo. As coletas foram realizadas no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) e no Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS). Os pacientes foram diagnosticados com base em dados clínicos e imunohistoquímicos.

Para a análise dos microarranjos foram utilizados 19 pacientes e 5 controles. Estas e as demais amostras que completam o total amostral foram utilizadas posteriormente para a validação dos dados pela reação em cadeia da DNA polimerase em tempo real (PCR-RT).

Cinco grupos de comparação foram utilizados no estudo. O primeiro foi composto por 5 pacientes com pênfigo foliáceo portadores da forma generalizada da doença e sem tratamento; o segundo por 5 pacientes com pênfigo foliáceo portadores da forma generalizada e submetidos a tratamento imunossupressor; o terceiro por 5 pacientes com pênfigo foliáceo portadores da forma localizada da doença e sem tratamento; o quarto por 4 pacientes com pênfigo vulgar e sem tratamento e o quinto grupo formado por indivíduos controles saudáveis. Os pacientes com pênfigo vulgar foram classificados como portadores de lesões apenas nas mucosas ou de lesões mucocutâneas. Os indivíduos controle estavam livres de qualquer doença ou tratamento. Foram excluídos da amostra pacientes que estivessem sem lesões ativas.

É importante salientar que todos os pacientes, incluindo os que estavam sob tratamento apresentavam lesões ativas, uma vez que a corticoterapia havia sido iniciada recentemente.

Além do sangue periférico, biópsias, incluindo tecido lesionado e não-lesionado, foram coletadas de 5 pacientes. Excluiu-se da amostra pacientes que estivessem com infecções secundárias nas lesões.

Na Tabela 1 é mostrada a caracterização geral das amostras coletadas, bem como a utilização de cada uma nos experimentos de microarranjos e reação em cadeia da DNA polimerase em tempo real (PCR-RT).

Os pacientes e controles foram esclarecidos quanto aos objetivos do estudo e uma extensa averiguação foi feita e documentada. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Tabela 1 - Caracterização dos pacientes e controles envolvidos no estudo.

Código	Amostra	Sexo	Tratam/	Forma	Idade	Ancestralidade	Microarranjo	PCR-RT	Biópsias
P501	PF	F		L	21	EU	x	x	x
P502	PF	F	x	G	29	EU	x	x	
P503	PF	F		L	37	AF	x	x	
P505	PF	F		G	27	EU + I	x	x	
P506	PF	M		G	15	AF	x	x	x
P507	PF	F		L	51	EU	x	x	x
P508	PF	M		L	32	EU		x	
P510	PF	F		L	26	EU	x	x	
P515	PF	F		G	39	EU	x	x	
P517	PF	M		G	33	EU	x	x	
P520	PF	M	x	G	12	AF	x	x	
P521	PF	F		G	41	AF	x	x	x
P522	PF	F		L	32	EU	x	x	
P523	PF	M	x	G	45	EU	x	x	
P524	PF	M		G	68	AF		x	
P527	PF	M	x	G	19	AF		x	
P529	PF	F	x	G	41	AF			x
PK216	PF	F		L	59	EU		x	
P255	PF	F		G	38	AF		x	
P261	PF	F	x	G	29	AF	x	x	
P262	PF	M	x	G	41	EU		x	
P111	PF	F		G	33	EU + I	x	x	
P504	PV	M		MC	52	EU	x	x	
P518	PV	F		MC	48	AF	x	x	
P519	PV	M		MC	42	EU	x	x	
P525	PV	F		MC	16	EU		x	
P526	PV	F		M	23	EU		x	
PV04	PV	F		M	24	EU + I	x	x	
C700	C	F			28	EU		x	
C701	C	M			27	EU		x	
C702	C	M			30	AF	x	x	
C703	C	M			52	AF	x	x	
C704	C	M			44	AF	x	x	
C705	C	F				EU		x	
C706	C	F				EU		x	
C638	C	M			33	AF	x	x	
C639	C	F			36	EU + I	x	x	

PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar; C: controles; L: forma localizada; G: forma generalizada; M: lesões mucosas; MC: lesões mucocutâneas; EU: origem predominantemente européia; AF: origem mista, predominantemente africana; EU+I: origem mista, européia e indígena.

4.2. Obtenção dos linfócitos T CD4⁺

4.2.1. Purificação de células por esferas magnéticas

Aproximadamente 25 mL de sangue periférico foram coletados e a fração de células mononucleares foi isolada por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Paque Plus (Amersham Bioscience, Upsala, Sweden). As células foram lavadas 3 vezes e ressuspendidas em PBS contendo 0,5% de soro bovino fetal (SBF) e 2 mM de citrato de sódio. A purificação das células T CD4⁺ foi realizada usando o CD4 MultiSort Kit (Mylteni Biotec), em colunas magnéticas.

Resumidamente, a viabilidade e a concentração celular foram determinadas utilizando-se contagem em câmara de Newbauer numa diluição 1:100 com corante azul de Trypan (Intermat, São Paulo, Brasil). Para a marcação magnética, 20 µl de anticorpos anti-CD4⁺ conjugado a microesferas metálicas (*microbeads*) foram utilizados para cada 10⁷ células. A suspensão foi incubada por 15 min a 4⁰C. Decorrido o tempo, fez-se a separação magnética passando a suspensão celular por uma coluna magnética do tipo LD (Mylteni Biotec) na qual as células marcadas com as microesferas ficam retidas. Estas foram eluídas após a remoção da coluna do campo magnético e utilizadas para a extração do RNA.

4.2.2. Citometria de fluxo

Uma alíquota das células purificadas após a separação com esferas magnéticas foi avaliada por citometria de fluxo para determinação do grau de pureza obtido com o processo de separação. As células foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais: CD4-PE, CD8-PE, CD3-FITC, além de anticorpos do tipo IgG de camundongo conjugados com PE e FITC, de especificidade irrelevante - IgG1-FITC e IgG2a-PE – usados para a quantificação da marcação inespecífica. Todos os anticorpos monoclonais foram fabricados pela BD (PharMingen, San Diego, USA). A marcação CD3⁺/CD4⁺ permitiu quantificar o grau de pureza das células obtidas, uma vez que o anticorpo anti-CD3 é específico para linfócitos T e anti-CD4 é específico para linfócitos CD4⁺. A marcação CD3⁺/CD8⁺ permite-nos saber se há uma contaminação das células

purificadas com linfócitos CD8. Já a marcação IgG1/IgG2a permite-nos avaliar se os anticorpos que estão sendo utilizados estão marcando células indesejadas, ou seja, de maneira inespecífica.

A marcação das células com os anticorpos específicos foi feita da seguinte maneira: 1×10^5 células purificadas células foi colocada em três tubos diferentes aos quais foram adicionados os seguintes pares de anticorpos: $CD3^+/CD4^+$, $CD3^+/CD8^+$ e IgG1/IgG2. As células foram incubadas com estes anticorpos durante 15 min a 4°C. Decorrido o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram dispensados e as amostras lavadas com 2 mL de tampão de FACS (solução de fosfato tamponada – PBS, acrescida de 2% de soro bovino fetal - SBF), sendo novamente centrifugadas. Ao final de todo o processo as células foram fixadas com 400 µL de PBS 1X acrescidos de 1% de formaldeído (JT Baker, Xalostoc, México). A aquisição das amostras foi realizada em citômetro FACScan (BD Bioscience) e a análise realizada no programa Cell Quest, de acordo com tamanho e granulosidade das células (FSC x SSC) compatíveis com linfócitos, assim como para a positividade de marcação com os anticorpos (Figura 3). Todas as amostras foram analisadas coletando-se dados de 10.000 eventos (linfócitos).

Os procedimentos foram iniciados imediatamente após a coleta do sangue e em todas as etapas as células foram mantidas sobre gelo ou incubadas com soluções geladas com o objetivo de minimizar possíveis alterações no perfil de expressão gênica secundárias ao tempo de manipulação ou alterações de temperatura. Ainda, nas primeiras separações fez-se uma marcação com anticorpos anti $CD4^+/CD69^+$. A finalidade desta marcação foi verificar se o processo de separação celular não estava causando ativação generalizada dos linfócitos, já que a molécula CD69 é um dos primeiros marcadores de ativação de linfócitos. A porcentagem de células marcadas foi menor que 0,7% para os 3 pacientes e 3 controles testados.

Figura 3 - Imunofenotipagem por citometria de fluxo para avaliação do grau de pureza de linfócitos T $CD4^+$ após separação celular magnética.

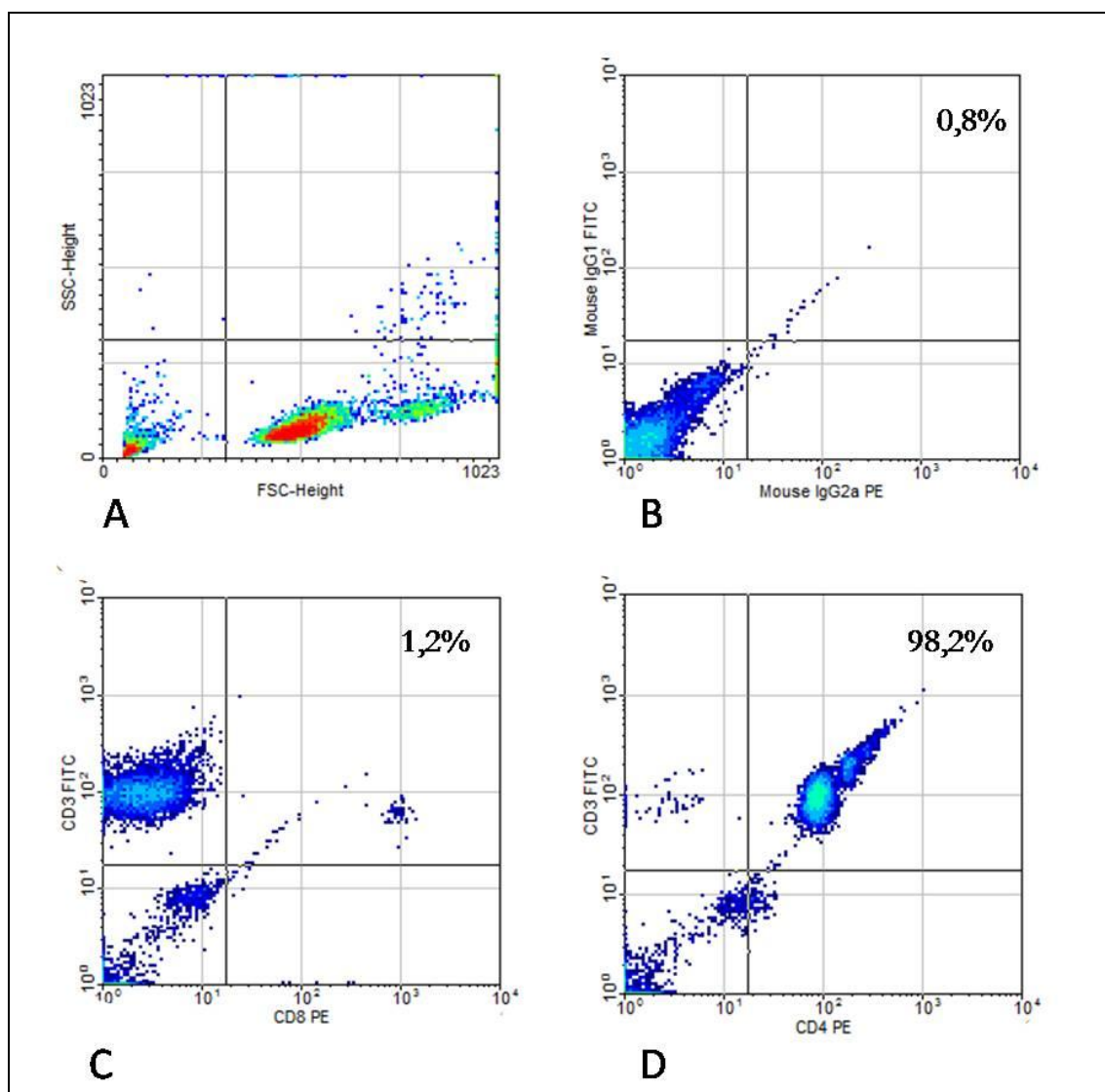


Figura 3 - Imunofenotipagem por citometria de fluxo para avaliação do grau de pureza de linfócitos T $CD4^+$ após separação celular magnética. Aqui é exemplificada a análise para o paciente P526. (A) População de linfócitos caracterizados de acordo com seu tamanho e granulosidade. (B) Avaliação da marcação com os isotipos controles, mostrando que a marcação inespecífica é de apenas 0,8%. (C) Avaliação da marcação com o anticorpo CD8, mostrando que a contaminação das células purificadas com linfócitos $CD3^+/CD8^+$ é de apenas 1,2%. (D) Avaliação do grau de pureza das células purificadas, mostrando que 98,2% das células obtidas são $CD3^+/CD4^+$. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina.

4.3. Obtenção das biópsias

As biópsias de pele de tecido lesionado e de tecido não-lesionado foram obtidas com Punch de 2 mm de diâmetro após anestesia local. As amostras de tecido não-lesionado foram coletadas a pelo menos 1 cm de distância da lesão. Assim que coletadas as amostras foram imediatamente submergidas em RNA Holder (BioAgency Biotecnologia), uma solução que preserva e estabiliza o RNA celular minimizando alterações de expressão gênica decorrentes de manipulação. As biópsias foram então congeladas a -80°C até a extração do RNA.

4.4. Extração do RNA

RNA total foi extraído dos linfócitos CD4^{+} isolados do sangue periférico e das biópsias de pele através de colunas de purificação com o “kit” comercial RNeasy (Qiagen) em conformidade com as orientações do fabricante. Precedendo a extração, as biópsias de pele foram rompidas e homogeneizadas utilizando um desagregador mecânico (Polytron, Germany) em tampão de lise de células contido no “kit” RNeasy.

A quantificação do RNA foi calculada a partir da absorvância a 260nm (obtida em espectrofotômetro), e a pureza, a partir da razão A_{260}/A_{280} . A qualidade do RNA obtido foi verificada pela integridade das bandas 28S e 18S por visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Para nenhuma das amostras houve degradação do RNA.

4.5. Hibridizações com os microarranjos de oligonucleotídeos

Para a realização dos ensaios de análise de expressão gênica, foram utilizados os microarranjos comerciais CodeLink™ Human Whole Genome (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Estas lâminas contêm aproximadamente 55.000 sondas representativas do genoma humano total. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Hematologia da USP de Ribeirão Preto (SP).

Um micrograma ($1,0\mu\text{g}$) de RNA total de cada amostra foi utilizado para gerar o RNA complementar (cRNA) biotinizado, utilizando o *kit CodeLink Expression Assay*

Reagent (GE Amersham), seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, o RNA total, juntamente com pequenas quantidades de RNA bacteriano usados como controle, foram submetidos à transcrição reversa utilizando *primers* oligo(dT) contendo a sequência promotora da RNA T7 polimerase, seguida pela síntese da segunda fita de DNA complementar (cDNA), e purificação do cDNA dupla-fita em colunas QIAquick (Qiagen). A partir do cDNA dupla-fita foi gerado cRNA marcado com biotina, por meio de uma reação de transcrição *in vitro* utilizando RNA polimerase T7 e biotina 11-UTP (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Este passo amplifica linearmente o RNA, mantendo a representatividade original da amostra. O cRNA marcado de cada amostra foi purificado com o *kit RNeasy* e quantificado por espectrofotometria. Para a hibridização, 10µg de cRNA de cada amostra foram fragmentados por aquecimento a 94°C por 20 minutos, em uma solução tampão adequada contendo magnésio. O cRNA fragmentado foi então injetado nas microcâmaras das lâminas de microarranjos e, depois de seladas, as lâminas foram incubadas por 18 horas a 37°C sob agitação intensa (300 RPM) em um *shaker* adaptado especificamente para manter as lâminas fixas na posição horizontal. Após a hibridização, os microarranjos foram incubados com um conjugado cianina-5-estreptavidina (*Cy5-Streptavidin conjugate*, Amersham Biosciences) e após as lavagens para conferir especificidade ao sinal e secagem rápida em centrífuga, a intensidade de fluorescência da cianina-5 nas lâminas foi detectada num escâner GenePix 4000B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) pelo uso do *software GenePix Pro 6.0*. As lâminas foram escaneadas a 650nm (fluorescência do Cy5) utilizando uma resolução de 10µm.

Para a determinação da intensidade do sinal de fluorescência dos diferentes *spots* da lâmina, as imagens obtidas foram analisadas com o programa *CodeLink Expression Analysis Software* (Amersham Biosciences). Em suma, este software reconhece os *spots* presentes na lâmina e quantifica a intensidade de fluorescência de cada *spot*.

O reconhecimento dos *spots* pelo programa é facilitado pela presença de *spots* especiais de referência (chamados de *Fiducials*). Estes referenciais correspondem a *spots* com biotina depositada de tal forma que a estreptavidina conjugada ao fluorocromo Cy5 se ligue. Desta forma, os *fiducials* localizados em posições específicas da lâmina são reconhecidos pelo software facilitando a pré-localização dos *spots* através de um *grid* (esquema de disposição dos *spots* na lamina). O *software* automaticamente refina a

localização dos *spots*, delimitando cada um deles de forma independente. A intensidade bruta de fluorescência é determinada para cada *spot* e o *background* local (fluorescência periférica ao *spot*) é subtraída para corrigir diferenças causadas por variações experimentais locais relacionadas à ligação inespecífica do fluorocromo. Estes valores corrigidos são então normalizados pela mediana dos valores de todos os *spots* da lâmina, de forma que diferentes lâminas (amostras) possam ser comparadas. Finalmente, os resultados foram exportados para planilhas do *software* Microsoft Excel para serem analisados.

4.6. PCR em Tempo Real

Para a realização dos estudos de PCR quantitativo em tempo real, 500 ng de RNA total de cada amostra foram utilizados na síntese de 25 µl de cDNA, através de transcrição reversa com o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram seguidas as orientações do fabricante, apenas com a adição de um inibidor de RNase (rRNasin; Promega, Madison, WI, EUA). A solução de cDNA foi então diluída 5 vezes para uso nas reações de PCR em tempo real.

As reações de PCR-RT foram realizadas pelo método *TaqMan*, num aparelho Mastercycler Ep Realplex (Eppendorf, Alemanha). Utilizou-se 5 µl do reagente específico *TaqMan Master Mix* (Applied Biosystems), 0,5 µl da sonda específica TaqMan, 2,5 µl de H₂O, e 2 µl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguidas pela ativação da DNA polimerase a 95°C por 10 min, e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s intercalados com hibridação e extensão a 60°C por 1 min. As reações foram preparadas em duplicatas, num volume final de 10 µl. Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas duplicatas foi de 2%, caso contrário os experimentos foram repetidos.

4.7. Análise dos dados

A análise dos dados dos microarranjos de oligonucleotídeos foi realizada através do teste *t* implementado no pacote de programas BRB ArrayTools versão 3.02 (Molecular

Statistics and Bioinformatics Section, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA). Trata-se de um teste de permutação multivariado, o qual foi computado com base em 1000 permutações randômicas adotando-se um limiar de significância de 0,01. A diferença de expressão foi considerada relevante quando maior que 1,5 vezes.

As análises dos dados de PCR em tempo real foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 4.03* (San Diego, CA, EUA). A expressão gênica relativa por PCR em tempo real foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual o *Ct* (*cycle threshold*) indica o número do ciclo no qual o sinal fluorescente alcançou o limiar e detecção. O ΔCt indica a normalização da reação feita pela diferença dos valores de expressão obtidos para o controle endógeno (genes mantenedores) em relação aos valores obtidos para o gene de interesse para cada amostra. Neste estudo foram utilizados dois controles endógenos para esta normalização – BACT (beta actina) e GUSB (beta glucoronidase) (TaqMan PDARs; Applied Biosystems). Mais precisamente, foi usada a média geométrica dos dois controles, já que houve uma correlação alta entre eles tanto para os linfócitos T CD4⁺ (0,94) quanto para as biópsias (0,93). A cada ciclo, o número de cópias numa reação de PCR duplica, assim, o número de ciclos que separa o ΔCt de uma amostra do ΔCt de outra amostra ($\Delta\Delta Ct$), reflete aproximadamente, a diferença existente entre as amostras, em termos de nível de expressão gênica relativa, bastando aplicar a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001). Como se utilizou mais de um controle endógeno os valores das diferenças nos níveis de expressão foram então apresentados como diferenças de expressão médias [$2^{-(\text{média geométrica } \Delta\Delta Ct)}$] entre os grupos comparados.

A significância estatística das diferenças de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ entre os diferentes grupos comparados foi calculada usando o teste não paramétrico de Mann Whitney com unicaudal. Já o teste t pareado unicaudal foi utilizado para avaliar a significância estatística das diferenças de expressão gênica entre as amostras de tecido lesionado e não-lesionado de pacientes. O limite de significância adotado foi de $P \leq 0,05$.

Genes selecionados como diferencialmente expressos por ANOVA com valores de *P* iguais ou inferiores a 0,01 entre todos os subgrupos amostrais foram utilizados para agrupar indivíduos através do método de agrupamento hierárquico. A análise foi realizada com o pacote de programas MEV (MultiExperiment Viewer) v. 4.1 (SAEED *et al.*, 2003).

A medida de similaridade utilizada foi “pearson uncentered” e o método de agrupamento foi o “average linkage”.

Análise de ontologia dos genes foi realizada com o programa FATIGO (Al-SHAHROUR *et al.*; 2004). O programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA v. 7.0, Redwood City, California) foi usado para avaliar se os genes encontrados como diferencialmente expressos neste trabalho já haviam sido encontrados como diferencialmente expressos em outras doenças autoimunes.

5. RESULTADOS

5.1. Grau de pureza dos linfócitos T CD4⁺ obtidos após separação magnética

A porcentagem de células CD4⁺ foi expressa em relação ao número total de células obtidas. A pureza das células CD4⁺ obtidas foi maior que 97% para todas as amostras de pacientes e controles analisados, conforme o verificado através de citometria de fluxo (dados não mostrados).

5.2. Controle de qualidade das hibridizações

As hibridizações das 24 amostras foram realizadas em 3 experimentos diferentes. A qualidade das diferentes hibridizações foi avaliada por meio dos controles internos presentes em cada lâmina. Enquanto o RNA bacteriano adicionado antes da síntese do cDNA deve ser detectado em *spots* específicos da lâmina (controles positivos), outros *spots* não devem hibridizar (controles negativos).

Nas Figuras 4 e 5 são mostrados os gráficos que representam os valores da intensidade do sinal para cada um dos controles positivos e negativos dos três experimentos, respectivamente. O sinal médio, o desvio padrão e o ruído são mostrados para cada um dos controles. O valor de intensidade para cada um dos controles corresponde à média de vários *spots* representativos do mesmo controle distribuídos pela lâmina.

Figura 4. Controles positivos nas hibridizações.

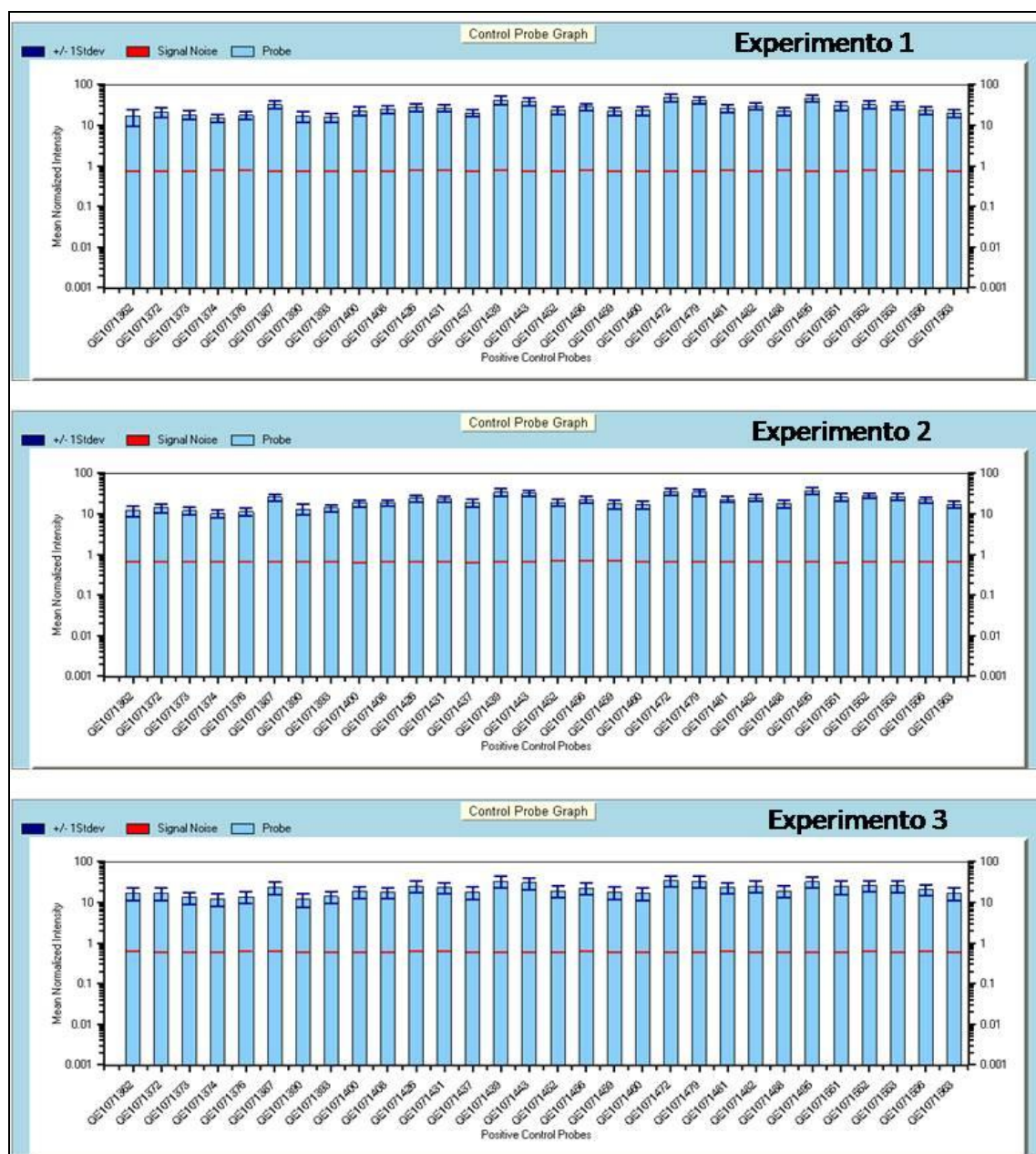


Figura 4. Gráficos mostrando que os valores de intensidade nas hibridizações para os controles positivos nas lâminas dos três experimentos estão todos acima do valor de background. O sinal médio, o desvio padrão e o ruído são mostrados para cada um dos controles.

Figura 5. Controles negativos nas hibridizações.

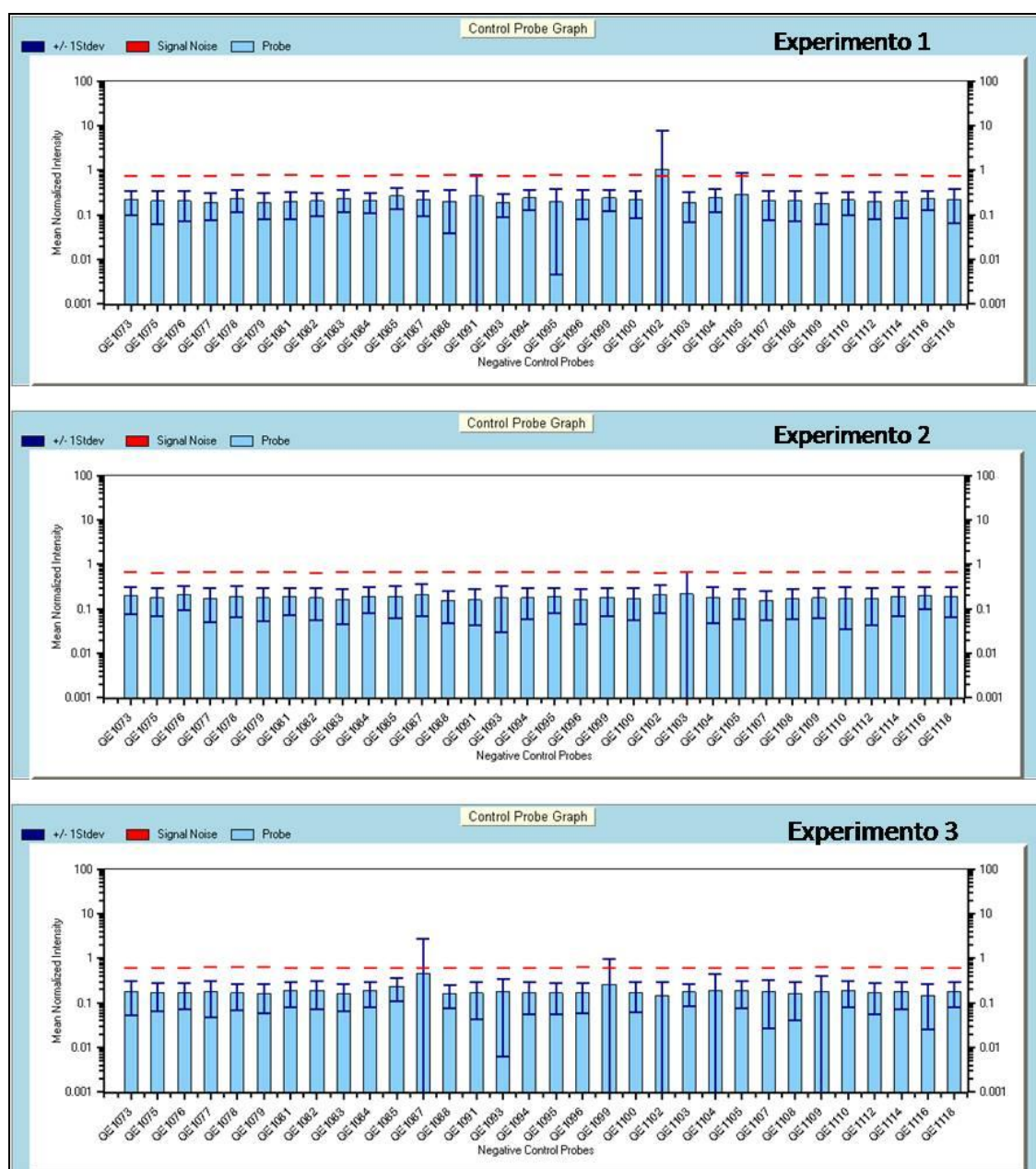


Figura 5. Gráfico mostrando que a quase totalidade dos valores de intensidade nas hibridizações para os controles negativos nas lâminas dos três experimentos têm o valor médio de intensidade abaixo do *background*. Até 5% de positividade para controles negativos é aceitável. O sinal médio, o desvio padrão e o ruído são mostrados para cada um dos controles.

5.3. Agrupamento (*clustering*) das amostras

Agrupamento (*clustering*) amostral hierárquico das amostras e genes diferencialmente expressos nos vários subgrupos de pacientes e controles foi usado para agrupar indivíduos com perfil de expressão similar em linfócitos T CD4⁺. Pacientes e controles formaram grupos distintos, confirmando a validade da expressão gênica diferencial numa escala global (Figura 6). Pacientes com a forma localizada do pênfigo foliáceo e pacientes com a forma generalizada da doença sob tratamento imunossupressor formaram um grupo misto. Isto não é surpreendente, pois sob tratamento, os indivíduos regredem gradualmente para uma forma menos grave da doença.

Os indivíduos controles agruparam do lado direito do gráfico e ficaram mais próximos do grupo misto formado por pacientes com a forma localizada e generalizada da doença sob tratamento. Já os pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo e sem tratamento agruparam próximos aos pacientes com pênfigo vulgar.

5.4. Genes diferencialmente expressos

O nível de expressão gênica diferencial que representa mudanças biologicamente importantes no pênfigo é desconhecido. Sendo assim, tomou-se o cuidado de não ser demasiadamente rigoroso ou demasiadamente permissivo na análise estatística. Considerou-se adequado o limite de significância de $P = 0,01$ com diferença de expressão igual ou maior que 1,5 vezes. A diferença de expressão (DF) representa o número de vezes que determinado gene está mais ou menos expresso num grupo em relação a outro. Genes hipotéticos ou sem função conhecida foram excluídos das listas neste momento, devido à impossibilidade de abordá-los neste estudo, em virtude do prazo para término do mesmo.

Figura 6. Agrupamento hierárquico dos dados de microarranjos de linfócitos T CD4⁺ em diferentes subgrupos de pacientes e controles.

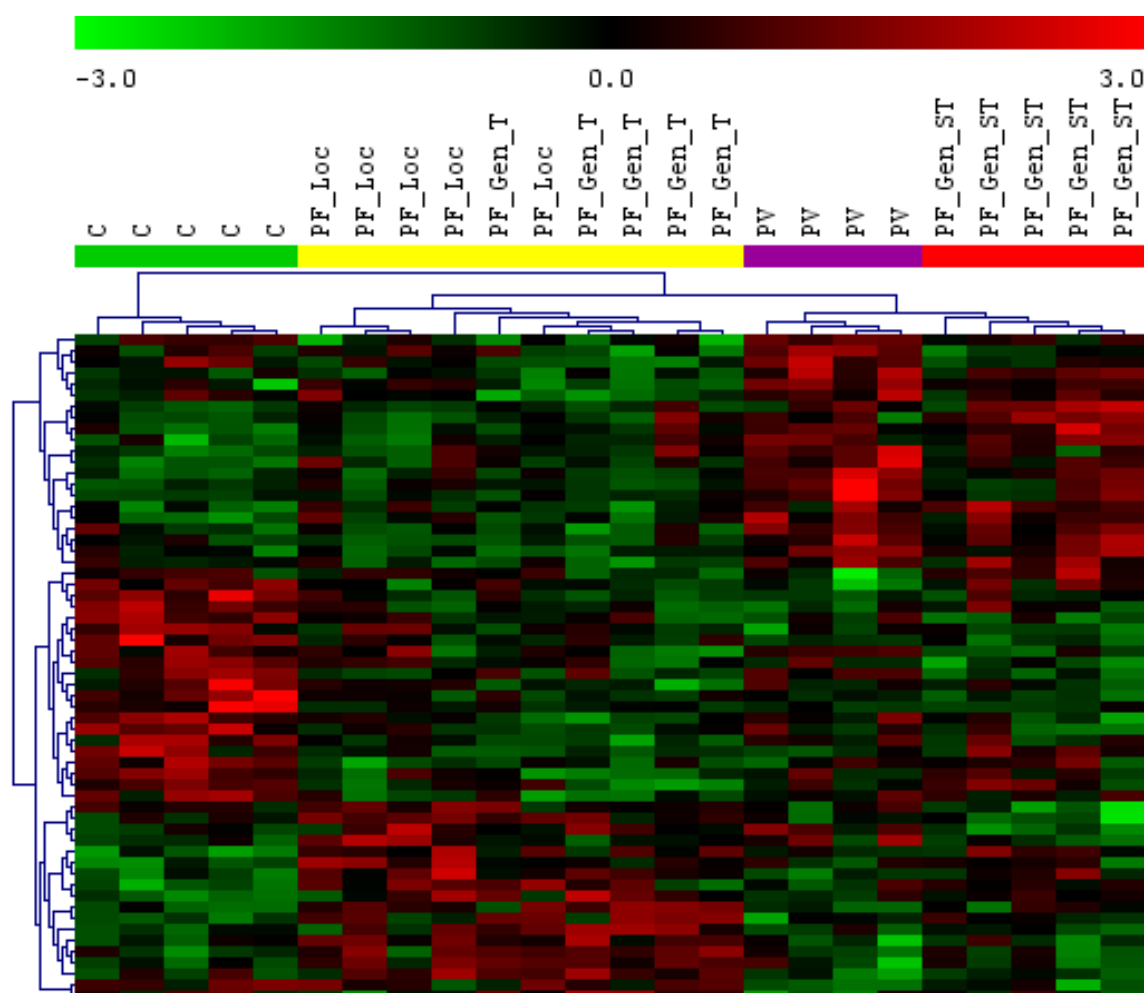


Figura 6. Agrupamento hierárquico dos dados de microarranjos de linfócitos T CD4⁺ em diferentes subgrupos de pacientes e controles. O nível de expressão é mostrado por cor: vermelho – nível de expressão alto; verde – expressão baixa. C: controles; PF_Gen_T: pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sob tratamento imunossupressor; PF_Gen_ST: pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sem tratamento; PF_Loc: pacientes com a forma localizada do pênfigo foliáceo; PV: pacientes com pênfigo vulgar.

5.4.1. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sem tratamento imunossupressor em relação aos controles

Foram encontrados 135 genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ isolados de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo e sem tratamento imunossupressor em relação aos linfócitos de indivíduos sadios (Tabela 2). Destes, 122 estão induzidos e 13 estão reprimidos. A classificação dos genes pelo *Gene Ontology* originou muitos registros de categorias de genes, já que um gene pode pertencer a várias categorias. As categorias mais representadas e de interesse para a autoimunidade foram: “processos metabólicos primários” para 47% dos genes; “resposta imune” para 27%; “resposta a stress” para 15%; “resposta de defesa” para 14%; “resposta inflamatória” para 9%; e “morte celular programada” para 16% dos genes. Na Figura 7 são mostrados os genes encontrados diferencialmente expressos nesta comparação para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes.

Tabela 2. Genes induzidos e reprimidos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos linfócitos de indivíduos controle.

Acesso ¹	Gene	Descrição	DF ²	Loc ³
NM_014358	CLECSF9	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 9	5,6	12p13
NM_000566	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	5,6	1q21
NM_001766	CD1D	CD1D antigen, d polypeptide	5,0	1q22
NM_152851	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	5,0	11q12
AI356564	CASR	qy15f01x1 NCI_CGAP_Brn23 cDNA clone IMAGE:2012089 3'	4,6	3q13
NM_033297	NALP12	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 12	4,2	19q13
NM_002029	FPR1	formyl peptide receptor 1	4,1	19q13
NM_000239	LYZ	lysozyme (renal amyloidosis)	4,0	12q15
NM_005874	LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	3,9	19q13
NM_021034	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	3,8	11p15
NM_001329	CTBP2	C-terminal binding protein 2, transcript variant 1	3,8	10q26

NM_052960	RBP7	retinol binding protein 7, cellular	3,7	1p36
NM_021201	MS4A7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7, transcript variant 1	3,7	11q12
NM_001337	CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	3,7	3p21
NM_002262	KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	3,6	12p13
NM_006682	FGL2	fibrinogen-like 2	3,5	7
NM_145699	APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	3,5	5q35
NM_031311	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like, transcript variant 1	3,5	7p15
NM_021958	HLX1	H20-like homeo box 1 (Drosophila)	3,4	1q41
NM_021250	LIR9	leukocyte Ig-like receptor 9, transcript variant 1	3,3	19q13
NM_001772	CD33	CD33 antigen (gp67)	3,3	19q13
NM_001785	CDA	cytidine deaminase	3,3	1p36
NM_020980	AQP9	aquaporin 9	3,3	15q22
NM_007283	MGLL	monoglyceride lipase	3,2	3q21
NM_006868	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family	3,2	18p11
NM_198481	LAIR	LAIR hlog (UNQ3033)	3,2	19q13
NM_005849	IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6	3,0	16p13
NM_031950	KSP37	Ksp37 protein	3,0	4p16
NM_006332	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	2,9	14q24
NM_007063	TBC1D8	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	2,9	2q11
NM_005213	CSTA	cystatin A (stefin A)	2,9	3q21
NM_170699	GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1	2,8	2q35
NM_000407	GP1BB	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	2,8	22q11
NM_003264	TLR2	toll-like receptor 2	2,8	4q32.
NM_016816	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa, transcript variant E18	2,8	12q24
NM_001769	CD9	CD9 antigen (p24)	2,7	12p13
NM_138444	KCTD12	potassium channel tetramerisation domain containing 12	2,7	13q21
NM_020856	ZNF537	zinc finger protein 537	2,7	...
NM_002413	MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	2,7	4q28
NM_052949	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4, transcript variant 3	2,6	19q13
NM_012198	GCA	grancalcin, EF-hand calcium binding protein	2,6	2
NM_004106	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	2,6	1q23.
NM_033423	GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	2,6	14q11.2
NM_015991	C1QA	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	2,6	1p36
NM_194447	CLECSF6	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 6 (CLECSF6), transcript variant 3	2,6	12p13
NM_014880	DCL-1	type I transmembrane C-type lectin receptor DCL-1	2,4	...
NM_000387	SLC25A20	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20, nuclear gene encoding mitochondrial protein	2,4	3p21

NM_001814	CTSC	cathepsin C, transcript variant 1	2,4	11q14
NM_005810	KLRG1	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	2,2	12p13
NM_006417	IFI44	interferon-induced protein 44	2,2	1p31.1
NM_004334	BST1	bone marrow stromal cell antigen 1	2,2	14q32
NM_004863	SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	2,2	14q24
NM_003733	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like L, transcript variant 1	2,1	12q24
NM_021213	PCTP	phosphatidylcholine transfer protein	2,1	17q21
NM_201625	MICL	myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor, transcript variant 3	2,0	...
BU626416	RPLP2	UI-H-FT0-bhm-c-16-0-UIs1 NCI_CGAP_FT0 cDNA clone UI-H-FT0-bhm-c-16-0-UI 3'	2,0	...
NM_033101	LGALS12	lectin, galactoside-binding, soluble, 12 (galectin 12)	2,0	11q13
NM_006841	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	2,0	3p21
NM_207035	NPD014	NPD014 protein (NPD014), transcript variant 1	2,0	...
NM_016428	ABI3	ABI gene family, member 3	2,0	17q21
NM_006573	TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	2,0	13q34
NM_003810	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	1,9	3q26
NM_021170	HES4	bHLH factor Hes4	1,9	1p36.33
NM_032986	SEC23B	Sec23 homolog B (S cerevisiae), transcript variant 3	1,9	20p11
NM_005601	NKG7	natural killer cell group 7 sequence, mRNA	1,9	19q13
NM_003661	APOL1	apolipoprotein L, 1, transcript variant 1	1,8	22q13.1
NM_003650	CST7	cystatin F (leukocystatin)	1,8	20p11
NM_015874	RBPSUH	recombining binding protein suppressor of hairless (Drosophila), transcript variant 2	1,8	4p15
NM_006837	COP55	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis)	1,8	8q13
NM_006111	ACAA2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase), nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,8	18q21
NM_016388	TRAT1	T-cell receptor interacting molecule	1,8	3q13
NM_003107	SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	1,8	6p22
NM_016129	COP54	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 4 (Arabidopsis)	1,8	4q21
NM_031216	SEC13L	sec13-like protein	1,8	...
NM_032857	LACTB	lactamase, beta, nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	1,7	15q22
NM_018475	TPARL	TPA regulated locus	1,7	...
NM_021822	APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G	1,7	22q12
NM_139281	WDR36	WD repeat domain 36	1,7	5q21
NM_016382	CD244	CD244 natural killer cell receptor 2B4	1,7	1q22
NM_020676	ABHD6	abhydrolase domain containing 6	1,7	3p14
NM_152581	MOSPD2	motile sperm domain containing 2	1,7	...
NM_138571	HINT3	histidine triad nucleotide binding protein 3	1,7	6q22

NM_002592	PCNA	proliferating cell nuclear antigen, transcript variant 1	1,7	20p12
NM_015994	ATP6V1D	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D	1,7	14q24
NM_013313	YPEL1	yippee-like 1 (Drosophila)	1,7	22q11
NM_003037	SLAMF1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	1,7	1q22
NM_006406	PRDX4	peroxiredoxin 4	1,7	Xp22
NM_005170	ASCL2	achaete-scute complex-like 2 (Drosophila)	1,6	11p15
NM_181777	UBE2A	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog)	1,6	Xq24
NM_014175	MRPL15	mitochondrial ribosomal protein L15, nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,6	8q11
NM_015485	RWDD3	RWD domain containing 3	1,6	1p21
NM_018046	VG5Q	angiogenic factor VG5Q	1,6	...
NM_080385	CPA5	carboxypeptidase A5	1,6	7q32
NM_003916	AP1S2	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	1,6	Xp22
NM_004627	WRB	tryptophan rich basic protein	1,6	21q22
NM_001359	DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,6	8q21
NM_005102	FEZ2	fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)	1,6	2p22
NM_001001740	COP1	constitutive photomorphogenic protein, transcript variant 2, mRNA	1,6	...
NM_006811	TDE1	tumor differentially expressed 1, transcript variant 1	1,6	...
NM_006416	SLC35A1	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1	1,6	6q15
NM_005701	RNUT1	RNA, U transporter 1	1,6	...
NM_014454	SESN1	sestrin 1	1,6	6q21
NM_002887	RARS	arginyl-tRNA synthetase	1,6	5q11
NM_015633	FGFR1OP2	FGFR1 oncogene partner 2	1,6	12p11.
NM_014426	SNX5	sorting nexin 5, transcript variant 2	1,6	20p11
NM_052942	GBP5	guanylate binding protein 5	1,6	1p22
NM_006912	RIT1	Ras-like without CAAX 1	1,5	1q22
NM_000628	IL10RB	interleukin 10 receptor, beta	1,5	21q22
NM_145243	MPRP-1	metalloprotease related protein 1	1,5	...
NM_014285	EXOSC2	exosome component 2	1,5	9q34
NM_019030	DHX29	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29	1,5	5q11
NM_006070	TFG	TRK-fused gene	1,5	3q11
NM_006908	RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1), transcript variant Rac1	1,5	7p22
NM_017906	PAK1IP1	PAK1 interacting protein 1	1,5	6p24
NM_022494	ZDHHC6	zinc finger, DHHC domain containing 6	1,5	10q25
NM_006144	GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	1,5	5q11
NM_000574	DAF	decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	1,5	1q32
NM_000801	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa, transcript variant 12B	1,5	20p13

NM_003151	STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	1,5	2q32
NM_000882	IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	1,5	3p12
NM_000318	PXMP3	peroxisomal membrane protein 3, 35kDa (Zellweger syndrome)	1,5	8q21
NM_003811	TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	1,5	19p13
NM_018684	HCA127	hepatocellular carcinoma-associated antigen 127	-1,5	...
NM_012216	MID2	midline 2, transcript variant 1	-1,5	Xq22
NM_015677	SH3YL1	SH3 domain containing, Ysc84-like 1 (S cerevisiae)	-1,5	2p25
NM_015335	THRAP2	thyroid hormone receptor associated protein 2	-1,5	12q24
NM_014400	C44A	GPI-anchored metastasis-associated protein homolog	-1,6	...
NM_005164	ABCD2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	-1,7	12q11
NM_006145	DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	-1,7	19p13
NM_002737	PRKCA	protein kinase C, alpha	-1,7	17q22
NM_006910	RBBP6	retinoblastoma binding protein 6, transcript variant 1	-1,7	16p12
NM_003890	FCGBP	Fc fragment of IgG binding protein	-1,9	19q13
NM_002955	RREB1	ras responsive element binding protein 1	-2,0	6p25
NM_003031	SIAH1	seven in absentia homolog 1 (Drosophila)	-2,1	16q12
NM_004625	WNT7A	wingless-type MMTV integration site family, member 7A	-2,2	3p25

¹ Indica o número de acesso ao Gene Bank; ² Diferença de expressão. O sinal negativo indica os genes reprimidos; ³ Localização cromossômica; ... dado não disponível.

5.4.2. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sob tratamento imunossupressor em comparação aos linfócitos de pacientes sem tratamento

Foram encontrados 55 genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ isolados de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo submetidos a tratamento imunossupressor em relação aos linfócitos pacientes sem qualquer tipo de tratamento (Tabela 3). Destes, 41 genes foram reprimidos em virtude do tratamento, enquanto 14 foram induzidos. A classificação dos genes pelo *Gene Ontology* originou as seguintes categorias: “comunicação celular” para 43% dos genes; “resposta imune” para 16%; “adesão celular” para 7%; “resposta de defesa” para 9%; “ativação de células T” para 9%; e “morte celular programada” para 13% dos genes. Na Figura 8 são mostrados os genes encontrados diferencialmente expressos nesta comparação para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes.

Figura 7 - Genes encontrados diferencialmente expressos entre pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos controles para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes.

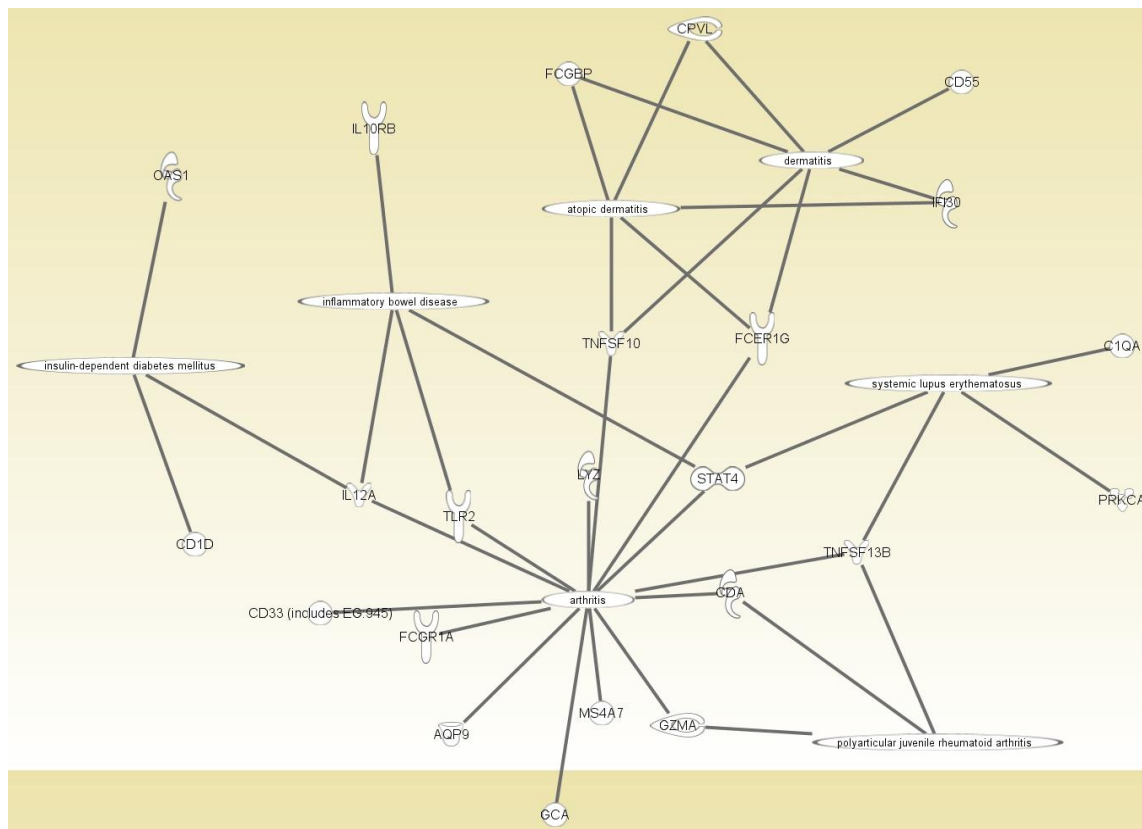


Figura 7 - Genes encontrados diferencialmente expressos entre pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos controles para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes. Estes dados foram obtidos de bancos de dados de observações publicadas utilizando programa Ingenuity Pathway Analysis.

Tabela 3. Genes induzidos e reprimidos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com forma generalizada do pênfigo foliáceo submetidos a tratamento imunossupressor em relação aos linfócitos de pacientes sem tratamento.

Acesso ¹	Gene	Descrição	DF ²	Loc ³
NM_001785	CDA	cytidine deaminase	-3,4	1p36
NM_152851	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A,	-3,3	11q12
NM_001766	CD1D	CD1D antigen, d polypeptide	-3,1	1q22
NM_014358	CLECSF9	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 9	-3,1	12p13
NM_002002	FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23A)	-2,9	19p13
NM_007283	MGLL	monoglyceride lipase	-2,6	3q21.3
NM_005248	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	-2,6	1p36.2
NM_033297	NALP12	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 12	-2,5	19q13
NM_007063	TBC1D8	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	-2,4	2q11
NM_000760	CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	-2,4	1p35
NM_002558	P2RX1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	-2,4	17p13
NM_005211	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog	-2,4	5q33
NM_005213	CSTA	cystatin A (stefin A)	-2,4	3q21
NM_020980	AQP9	aquaporin 9	-2,3	15q22
NM_004106	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	-2,2	1q23
NM_033101	LGALS12	lectin, galactoside-binding, soluble, 12 (galectin 12)	-2,1	11q13
NM_004479	FUT7	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	-2,1	9q34
NM_032152	PRAM-1	PRAM-1 protein	-2,1	19p13
NM_015991	C1QA	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	-2,0	1p36
NM_000887	ITGAX	integrin, alpha X (antigen CD11C (p150), alpha polypeptide)	-2,0	16p11
NM_002413	MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	-1,9	4q28.3
NM_000694	ALDH3B1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	-1,9	11q13
NM_001823	CKB	creatine kinase, brain	-1,9	14q32
NM_053054	CATSPER1	cation channel, sperm associated 1	-1,8	11q12
NM_013447	EMR2	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2, transcript variant 1	-1,8	19p13
NM_024317	ILT10	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 5	-1,8	19q13
NM_006120	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	-1,8	6p21.3
NM_002305	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	-1,8	22q13
NM_015481	ZNF385	zinc finger protein 385	-1,8	12q13
NM_013447	EMR2	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2, transcript variant 1	-1,7	19p13
NM_003078	SMARCD3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	-1,7	7q35
NM_005900	SMAD1	SMAD, mothers against DPP homolog 1 (Drosophila)	-1,7	4q31
NM_005620	S100A11	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	-1,6	1q21
NM_004049	BCL2A1	BCL2-related protein A1	-1,6	15q24

NM_005583	LYL1	lymphoblastic leukemia derived sequence 1	-1,6	19p13
NM_014468	VENTX2	VENT-like homeobox 2	-1,5	10q26
NM_006573	TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	-1,5	13q32
NM_022792	MMP19	matrix metalloproteinase 19, transcript variant rasi-9	-1,5	12q14
NM_004598	SPOCK	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican)	-1,5	5q31
NM_000245	MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	-1,5	7q31
NM_000601	HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	-1,4	7q21
NM_004570	PIK3C2G	phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide	1,5	12p12
NM_006599	NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	1,5	16q22
NM_003437	ZNF136	zinc finger protein 136 (clone pHZ-20)	1,5	19p13
NM_001173	ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5	1,5	14q12
NM_005786	SDCCAG33	serologically defined colon cancer antigen 33	1,5	18q22
NM_002221	ITPKB	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	1,5	1q42
NM_003828	MTMR1	myotubularin related protein 1, transcript variant 1	1,5	Xq28
NM_001400	EDG1	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	1,5	1p21
NM_181523	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha), transcript variant 1	1,6	5q13.1
NM_007054	KIF3A	kinesin family member 3A	1,6	5q31
NM_001949	E2F3	E2F transcription factor 3	1,6	6p22
NM_002655	PLAG1	pleiomorphic adenoma gene 1 (PLAG1)	1,7	8q12
NM_003844	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	1,7	8p21
NM_006060	ZNFN1A1	zinc finger protein, subfamily 1A, 1 (Ikaros)	1,9	7p13

¹ Indica o número de acesso ao Gene Bank; ² Diferença de expressão. O sinal negativo indica os genes reprimidos; ³ Localização cromossômica.

Figura 8. Genes encontrados diferencialmente expressos entre pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sob tratamento imunossupressor em relação aos pacientes sem tratamento para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes.

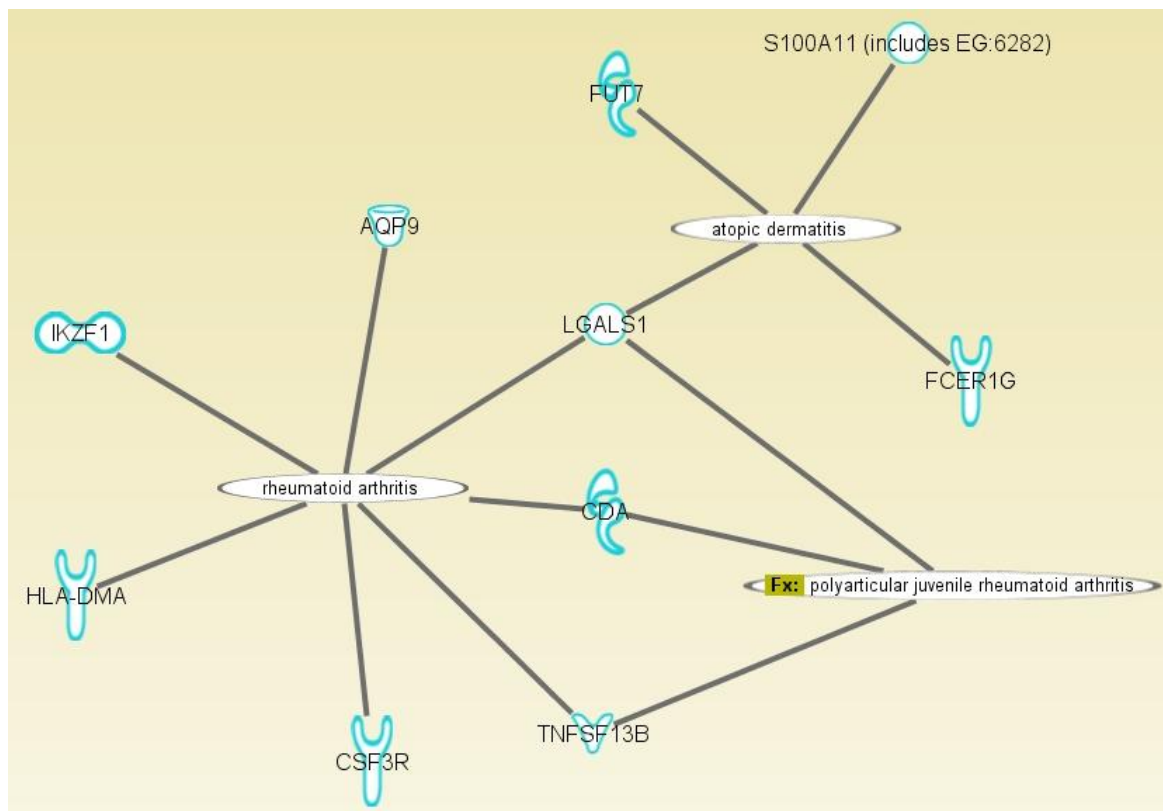


Figura 8. Genes encontrados diferencialmente expressos entre pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sob tratamento imunossupressor em relação aos pacientes sem tratamento para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes. Estes dados foram obtidos de bancos de dados de observações publicadas utilizando programa Ingenuity Pathway Analysis.

5.4.3. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T $CD4^+$ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em comparação aos linfócitos de pacientes com a forma localizada

Foram encontrados 65 genes diferencialmente expressos em linfócitos T $CD4^+$ isolados de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos linfócitos pacientes portadores da forma localizada da doença (Tabela 4). Destes, 49 genes estão induzidos e 16 estão reprimidos nos pacientes com a forma generalizada. A

classificação dos genes pelo *Gene Ontology* originou as seguintes categorias: “processos metabólicos primários” para 38% dos genes; “resposta imune” para 15%; “quimiotaxia” para 5%; “processamento e apresentação de antígenos” para 8%; “ativação de células T” para 6%; e “morte celular programada” para 9% dos genes. Na Figura 9 são mostrados os genes encontrados diferencialmente expressos nesta comparação para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes.

Tabela 4. Genes induzidos e reprimidos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos linfócitos de pacientes com a forma localizada da doença.

Acesso ¹	Gene	Descrição	DF ²	Loc ³
NM_001785	CDA	cytidine deaminase	3,4	1p36
NM_152851	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	2,8	11q12
NM_001766	CD1D	CD1D antigen, d polypeptide	2,8	1q22
NM_001772	CD33	CD33 antigen (gp67)	2,7	19q13
NM_020856	ZNF537	zinc finger protein 537	2,6	19q12
NM_006868	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family	2,4	18p11
NM_138444	KCTD12	potassium channel tetramerisation domain containing 12	2,4	13q22
NM_007283	MGLL	monoglyceride lipase	2,4	3q21.3
NM_033297	NALP12	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 12	2,3	19q13
NM_004079	CTSS	cathepsin S	2,2	1q21
NM_005572	LMNA	lamin A/C, transcript variant 2	2,2	1q21
NM_004479	FUT7	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	2,2	9q34
NM_021966	TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma 1A	2,1	14q32
NM_006841	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	2,1	3p21
NM_002118	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta	2,1	6p21
NM_001001 419	SMAD5	SMAD, mothers against DPP homolog 5 (Drosophila), transcript variant 2	2,1	5q31
NM_033101	LGALS12	lectin, galactoside-binding, soluble, 12 (galectin 12)	2,1	11q13
NM_033423	GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	2,0	14q11
NM_031311	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like, transcript variant 1	2,0	7p15
NM_003816	ADAM9	a disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	2,0	8p11
NM_182676	PLTP	phospholipid transfer protein, transcript variant 2	2,0	20q12
NM_021126	MPST	mercaptopyruvate sulfurtransferase	1,9	22q13

NM_000632	ITGAM	integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)	1,9	16p11
NM_002305	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	1,9	22q13
NM_002121	HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	1,9	6p21.3
NM_002306	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	1,9	14q21
NM_004195	TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18, transcript variant 1	1,8	1p36.3
NM_021213	PCTP	phosphatidylcholine transfer protein	1,8	17q21
NM_053054	CATSPER1	cation channel, sperm associated 1	1,8	11q12
NM_006863	LILRA1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1	1,8	19q13
NM_145313	RASGEF1A	RasGEF domain family, member 1A	1,8	10q11
NM_005601	NKG7	natural killer cell group 7 sequence, mRNA	1,8	19q13
NM_023003	TM6SF1	transmembrane 6 superfamily member 1	1,7	15q24
NM_006851	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	1,7	12q21
NM_003853	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	1,7	2q12
NM_001903	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	1,6	5q31
NM_006120	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	1,6	6p21
NM_005620	S100A11	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	1,6	1q21
NM_002121	HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	1,6	6p21
NM_004598	SPOCK	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican)	1,6	5q31
NM_002966	S100A10	S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	1,6	1q21
NM_004039	ANXA2	annexin A2	1,6	15q21
NM_001153	ANXA4	annexin A4	1,6	2p13
NM_022001	DAMS	SMAD in the antisense orientation , mRNA	1,6	5q31.1
NM_003390	WEE1	WEE1 homolog (S pombe)	1,5	11p15
NM_181657	LTB4R	leukotriene B4 receptor	1,5	14q11
NM_207035	NPD014	NPD014 protein (NPD014), transcript variant 1	1,5	1p36
NM_000325	PITX2	paired-like homeodomain transcription factor 2, transcript variant 3	1,5	4q25
NM_181777	UBE2A	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog), transcript variant 3	1,5	Xq24
NM_024316	LENG1	leukocyte receptor cluster (LRC) member 1	-1,5	19q13
NM_004808	NMT2	N-myristoyltransferase 2	-1,5	10p13
NM_004876	ZNF254	zinc finger protein 254	-1,5	19p12
NM_006209	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	-1,5	8q24
NM_003438	ZNF137	zinc finger protein 137 (clone pHZ-30)	-1,5	19q13
NM_003803	MYOM1	myomesin 1 (skelemin) 185kDa	-1,6	18p11
NM_000247	MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	-1,6	6p21
NM_004064	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	-1,7	12p13
NM_001970	EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	-1,7	17p13

NM_020954	CD8b	KIAA1618 (KIAA1618) CD8b	-1,7	17q25
NM_002737	PRKCA	protein kinase C, alpha	-1,8	17q22
NM_020404	CD164L1	CD164 sialomucin-like 1	-2,0	11q13
NM_182524	ZNF595	zinc finger protein 595	-2,4	4p16.3
NM_003444	ZNF154	zinc finger protein 154 (pHZ-92)	-2,4	19q13
BX505662	NUP133	DKFZp686E06207_r1 686 (synonym: hlcc3) cDNA clone DKFZp686E06207 5'	-2,5	1q42
BX114572	ZNF331	Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGp998E23114	-3,6	19q13

¹ Indica o número de acesso ao Gene Bank; ² Diferença de expressão. O sinal negativo indica os genes reprimidos; ³ Localização cromossômica.

Figura 9. Genes encontrados diferencialmente expressos entre pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos pacientes com a forma localizada da doença para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes.

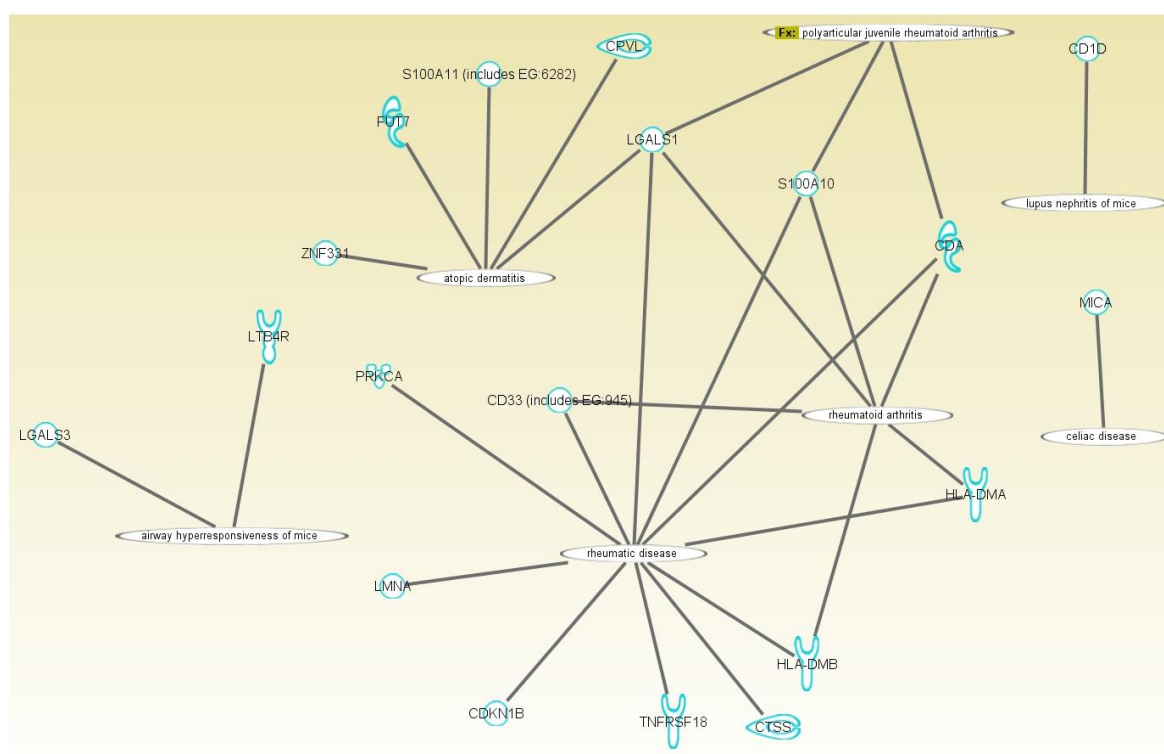


Figura 9. Genes encontrados diferencialmente expressos entre pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos pacientes com a forma localizada da doença para os quais já foram encontradas diferenças de expressão em outros distúrbios imunes. Estes dados foram obtidos de bancos de dados de observações publicadas utilizando programa Ingenuity Pathway Analysis.

5.4.4. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com pênfigo foliáceo em relação aos controles e compartilhado por pacientes com pênfigo vulgar em relação aos controles

Para se identificar os genes diferencialmente expressos em linfócitos de pacientes com PF e compartilhados pelos pacientes com PV, ambos em relação aos controles, fez-se cada uma das comparações separadamente e os genes compartilhados entre as duas comparações foram identificados (Tabela 5). Os genes diferencialmente expressos nos linfócitos de pacientes com PV em comparação com os controles é mostrada no ANEXO 1.

Foram encontrados 31 genes diferencialmente expressos compartilhados pelos dois fenótipos.

Tabela 5. Genes induzidos e reprimidos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com pênfigo foliáceo e compartilhados por pacientes com pênfigo vulgar, em relação aos linfócitos de indivíduos controle.

Acesso ¹	Gene	Descrição	C x PF ²	C x PV ³	Loc ⁴
NM_001766	CD1D	CD1D antigen, d polypeptide	5,6	4,4	1q22
NM_014358	CLECSF9	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 9	5,6	4,9	12p13
NM_000566	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	5,6	4,8	1q21.2
NM_021034	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	4,0	4,5	11p15
NM_001337	CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	3,7	2,9	3p21
NM_002262	KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1 transcript variant 1	3,7	2,7	12p13
NM_020980	AQP9	aquaporin 9	3,3	2,9	15q22
NM_007283	MGLL	monoglyceride lipase	3,3	3,8	3q21
NM_005213	CSTA	cystatin A (stefin A)	3,0	2,8	3q21
NM_006332	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	3,0	2,9	14q24
NM_000574	DAF	decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	2,8	1,6	1q32
NM_001769	CD9	CD9 antigen (p24)	2,8	2,4	12p13
NM_004106	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	2,6	2,6	1q23.
NM_033423	GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	2,6	2,4	14q11.2
NM_000387	SLC25A20	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20, nuclear gene encoding mitochondrial protein	2,5	2,2	3p21
NM_201625	MICL	myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor	2,1	2,0	...
NM_207035	NPD014	NPD014 protein (NPD014), transcript variant 1	2,0	1,6	1p36
NM_016428	ABI3	ABI gene family, member 3	2,0	2,0	17q21
NM_005601	NKG7	natural killer cell group 7 sequence	1,9	1,9	19q13

NM_003661	APOL1	apolipoprotein L, 1	1,9	1,9	22q13.1
NM_003650	CST7	cystatin F (leukocystatin)	1,8	1,7	20p11
NM_032857	LACTB	lactamase, beta (LACTB), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	1,8	1,7	15q22
NM_181777	UBE2A	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog)	1,7	1,6	Xq24
NM_001359	DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,6	1,9	8q21
NM_014454	SESN1	sestrin 1	1,6	1,4	6q21
NM_145243	MPRP-1	metalloprotease related protein 1	1,5	1,5	...
NM_006868	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family	1,4	3,7	18p11
NM_000407	GP1BB	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	1,4	4,2	22q11
NM_006627	POP4	processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP subunit (S cerevisiae)	1,4	1,3	...
NM_003031	SIAH1	seven in absentia homolog 1 (Drosophila)	-2,0	-2,0	16q12

¹ Indica o número de acesso ao Gene Bank; ² Diferença de expressão entre pacientes com PF em relação aos controles; ³ Diferença de expressão entre pacientes com PV em relação aos controles. O sinal negativo indica os genes reprimidos; ⁴ Localização cromossômica; ... dado não disponível.

5.5. Validação dos dados dos microarranjos

Com o objetivo de validar os resultados de expressão gênica obtidos pelos microarranjos usando um método alternativo de quantificação da expressão gênica e estender a análise para um número maior de pacientes e controles, foram selecionados 15 genes diferencialmente expressos nos diferentes subgrupos amostrais e a expressão dos mesmos foi quantificada por PCR em tempo real (PCR-RT). Os critérios para a escolha destes genes foram os seguintes: i) que fossem genes relacionados a respostas imunes; ii) que proporcionassem uma cobertura ampla dos genes diferencialmente expressos, ou seja, incluíssem genes com diferenças de expressão maiores (próximas de 5 vezes), bem como genes com diferenças menores (próximas de 2 vezes); iii) que incluíssem genes induzidos e reprimidos. Baseando-se nestes critérios, os seguintes genes foram analisados: *CD1D*, *CD3G*, *CDA*, *CX3CR1*, *DNAJB1*, *GZMA*, *GZMB*, *GZMH*, *IFI30*, *LGALS1*, *LGALS3*, *LILRB2*, *LYZ*, *NKG7* e *TNFSF13B*. Note-se que a PCR-RT foi feita apenas para os subgrupos nos quais se verificou expressão gênica diferencial nos microarranjos.

A expressão destes mesmos 15 genes foi analisada também em amostras de biópsias de pele com o objetivo de verificar *in loco* se as diferenças de expressão gênica observadas para linfócitos CD4 positivos coincidiam ou não com os achados das biópsias (Figuras 10 a 24). A expressão do gene *GZMB* nas biópsias esteve abaixo do nível de detecção, por isso não há gráfico representativo do resultado.

Nas biópsias verificou-se também a expressão de outros 11 genes para os quais não foram encontradas diferenças de expressão no sangue periférico. Foram eles: *CTLA4*, *IL10*, *IL4*, *TNFSF18*, *GATA3*, *FOXP3*, *TGFB1*, *IFNG*, *CXCR4*, *CD40* e *CD40L* (Figura 25). Estes genes foram escolhidos por participarem do processo de polarização de células T para uma resposta Th2, por serem marcadores do envolvimento de células T reguladoras ou serem marcadores da infiltração de linfócitos T ativados no sítio inflamatório. Não há resultado para os genes *IL4* e *IFNG*, pois a expressão dos mesmos também esteve abaixo do nível de detecção.

Em todos os gráficos as barras representam a mediana do valor de expressão de cada grupo. Foram considerados significativos os resultados cujos valores de *P* ficaram abaixo de 0,05. Estes se encontram em cada gráfico, abaixo do nome de cada gene.

Para todos os gráficos a seguinte legenda é válida:

<p>Cont: controles;</p> <p>Gen ST: pacientes com a forma generalizada de pênfigo foliáceo e sem tratamento;</p> <p>Gen T: pacientes com a forma generalizada de pênfigo foliáceo com tratamento imunossupressor;</p> <p>Loc: pacientes com a forma localizada de pênfigo foliáceo;</p> <p>PV: pacientes com pênfigo vulgar;</p> <p>L: tecido lesionado;</p> <p>NL: tecido não-lesionado.</p> <p>DF: diferença mediana de expressão.</p>

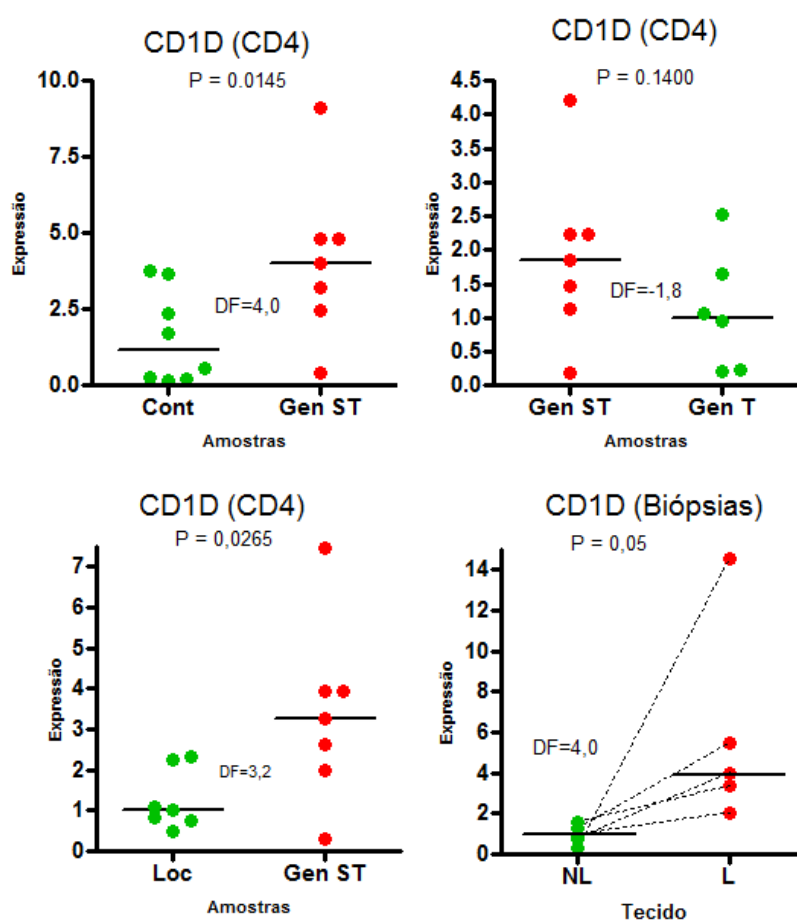


Figura 10. Expressão gênica diferencial do gene *CD1D* em linfócitos T $CD4^+$ nos diferentes subgrupos amostrais comparados (A-C) e em biópsias de pele (D).

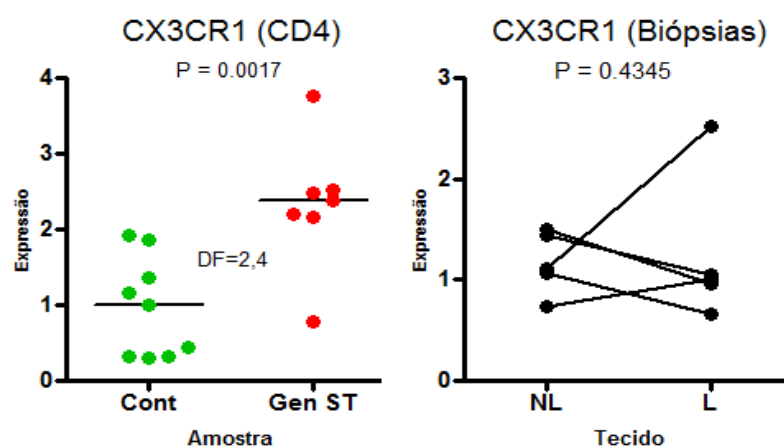


Figura 11. Expressão gênica diferencial do gene *CX3CR1* em linfócitos T $CD4^+$ de pacientes com a forma generalizada sem tratamento em relação aos controles (A) e em biópsias de pele (B).

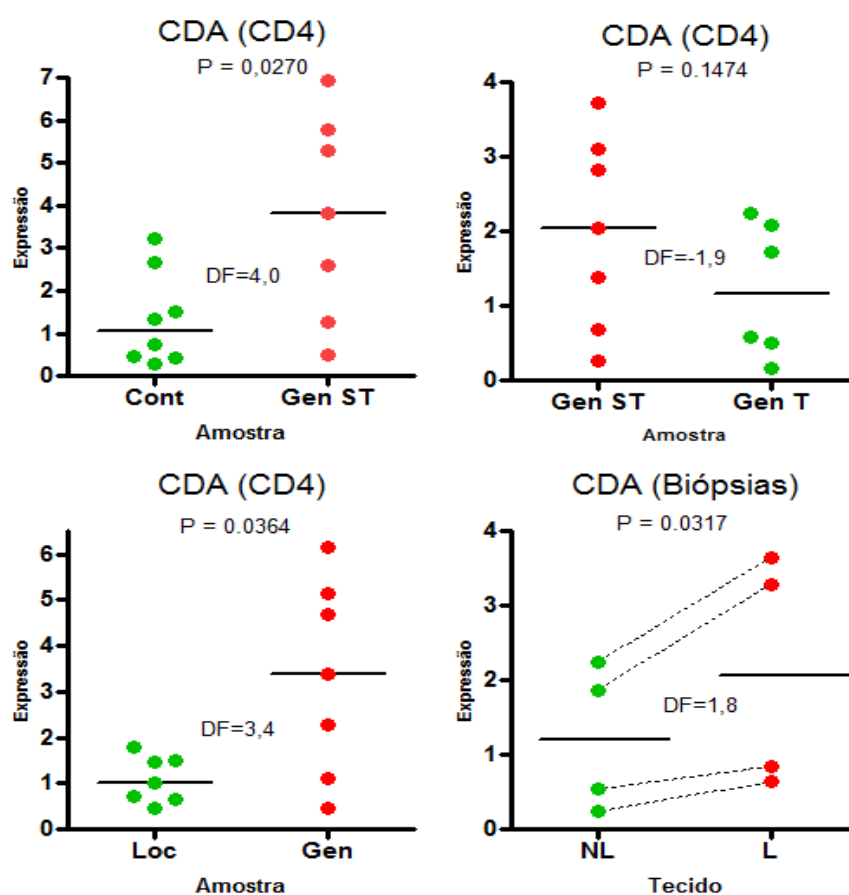


Figura 12. Expressão gênica diferencial do gene *CDA* em linfócitos T CD4⁺ nos diferentes subgrupos amostrais comparados (A-C) e em biópsias de pele (D).

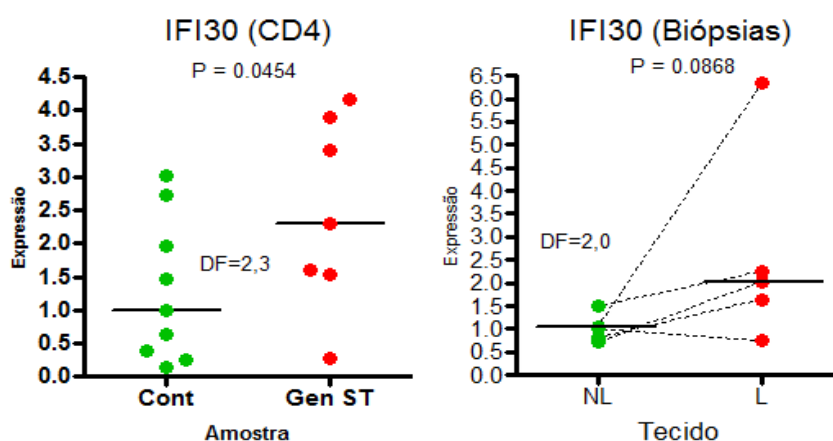


Figura 13. Expressão gênica diferencial do gene *IFI30* em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a forma generalizada sem tratamento em relação aos controles (A) e em biópsias de pele (B).

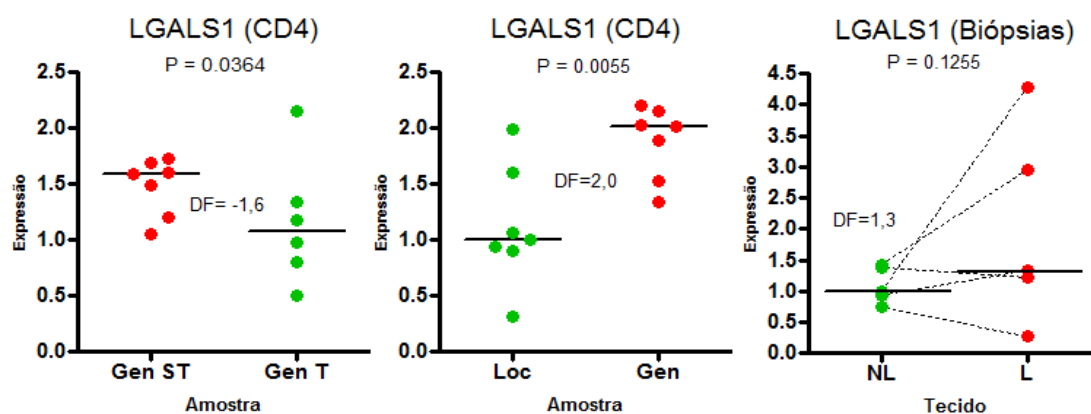


Figura 14. Expressão gênica diferencial do gene *LGALS1* em linfócitos T $CD4^+$ nos diferentes subgrupos amostrais comparados (A e B) e em biópsias de pele (C).

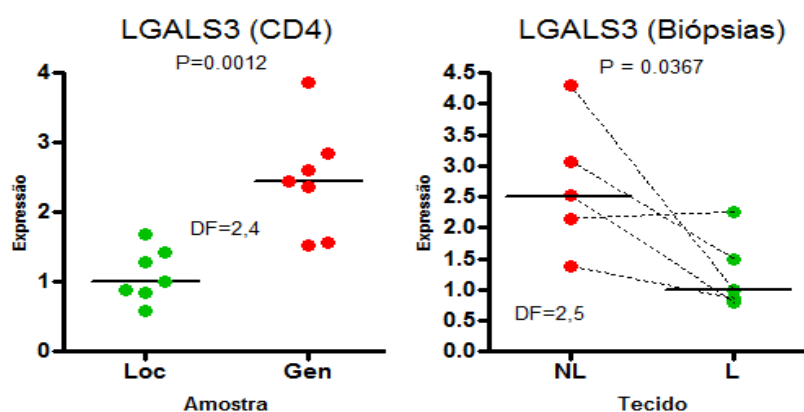


Figura 15. Expressão gênica diferencial do gene *LGALS3* em linfócitos T $CD4^+$ de pacientes com a forma generalizada sem tratamento em relação aos pacientes com a forma localizada (A) e em biópsias de pele (B).

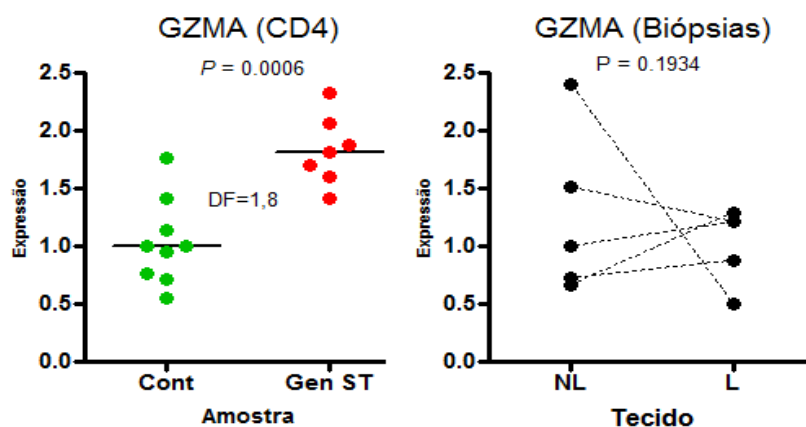


Figura 16. Expressão gênica diferencial do gene *GZMA* em linfócitos T $CD4^+$ de pacientes com a forma generalizada sem tratamento em relação aos controles (A) e em biópsias de pele (B).

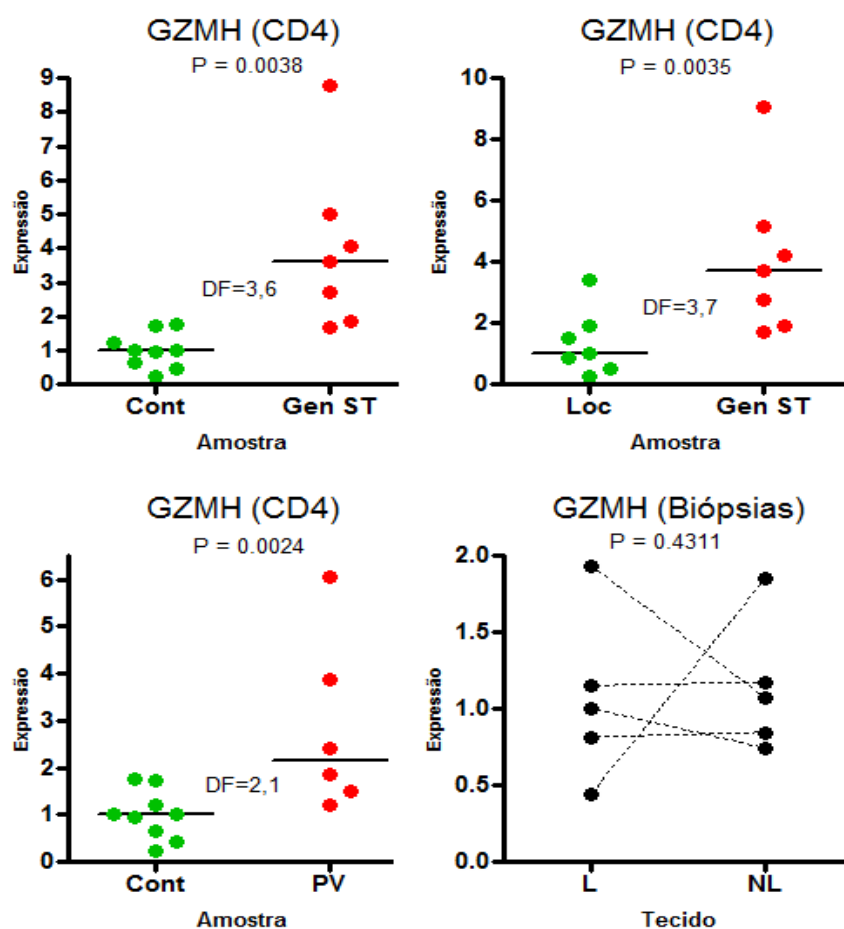


Figura 17. Expressão gênica diferencial do gene *GZMH* em linfócitos T CD4⁺ nos diferentes subgrupos amostrais comparados (A-C) e em biópsias de pele (D).

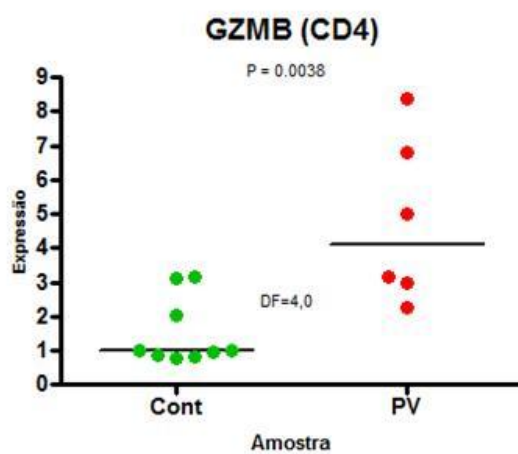


Figura 18. Expressão gênica diferencial do gene *GZMB* em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com pênfigo vulgar em relação aos controles,

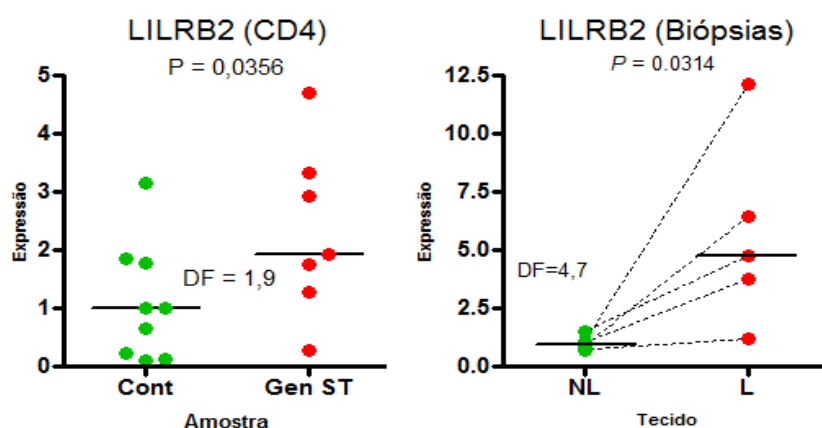


Figura 19. Expressão gênica diferencial do gene *LILRB2* em linfócitos T $CD4^+$ de pacientes com a forma generalizada sem tratamento em relação aos controles (A) e em biópsias de pele (B).

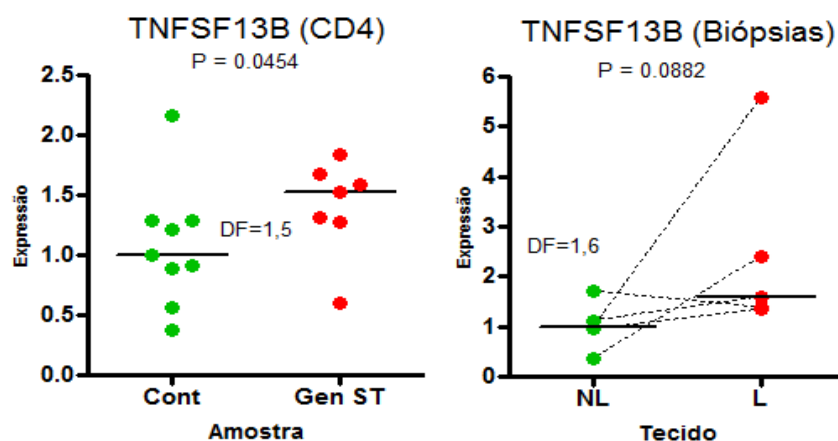


Figura 20. Expressão gênica diferencial do gene *TNFSF13B* em linfócitos T $CD4^+$ de pacientes com a forma generalizada sem tratamento em relação aos controles (A) e em biópsias de pele (B).

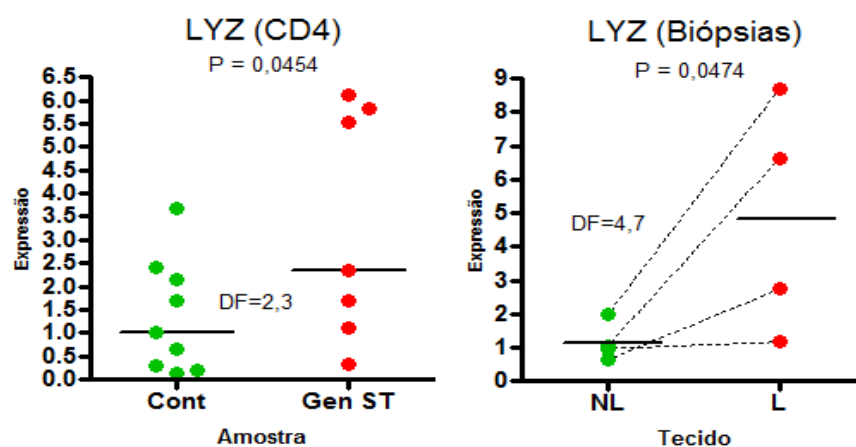


Figura 21. Expressão gênica diferencial do gene *LYZ* em linfócitos T $CD4^+$ de pacientes com a forma generalizada sem tratamento em relação aos controles (A) e em biópsias de pele (B).

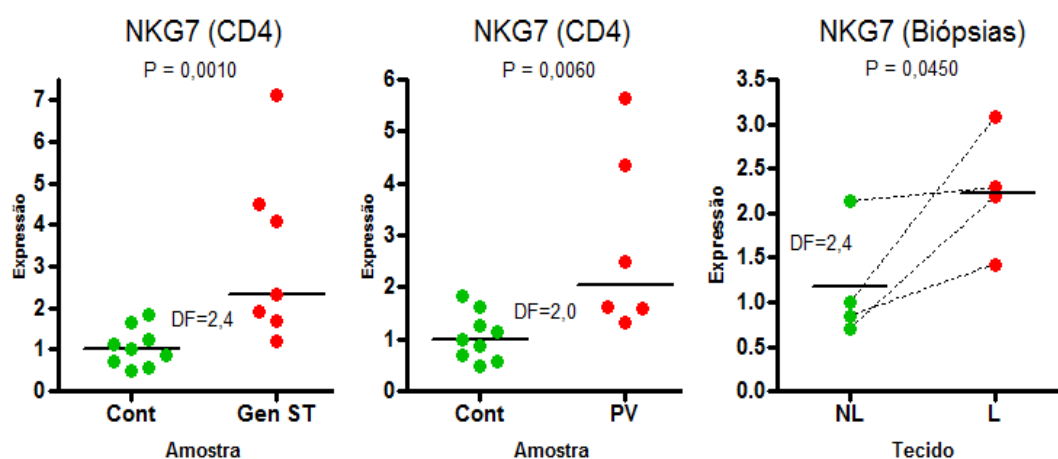


Figura 22. Expressão gênica diferencial do gene *NKG7* em linfócitos T $CD4^+$ nos diferentes subgrupos amostrais comparados (A-B) e em biópsias de pele (C).

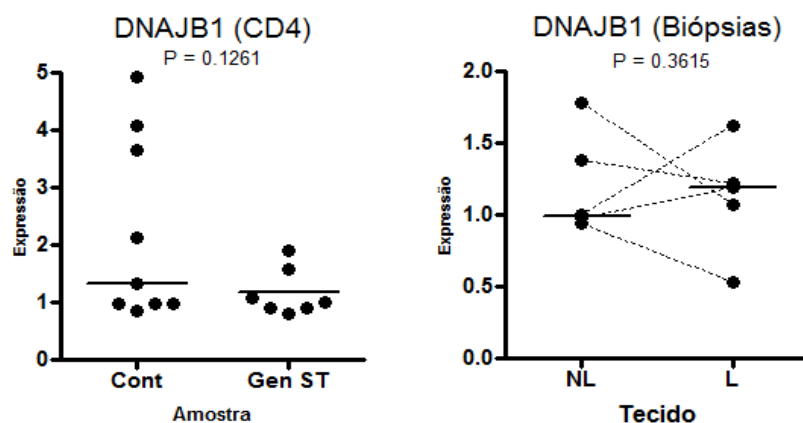


Figura 23. Expressão gênica do gene *DNAJB1* em linfócitos T $CD4^+$ de pacientes com a forma generalizada sem tratamento em relação aos controles (A) e em biópsias de pele (B).

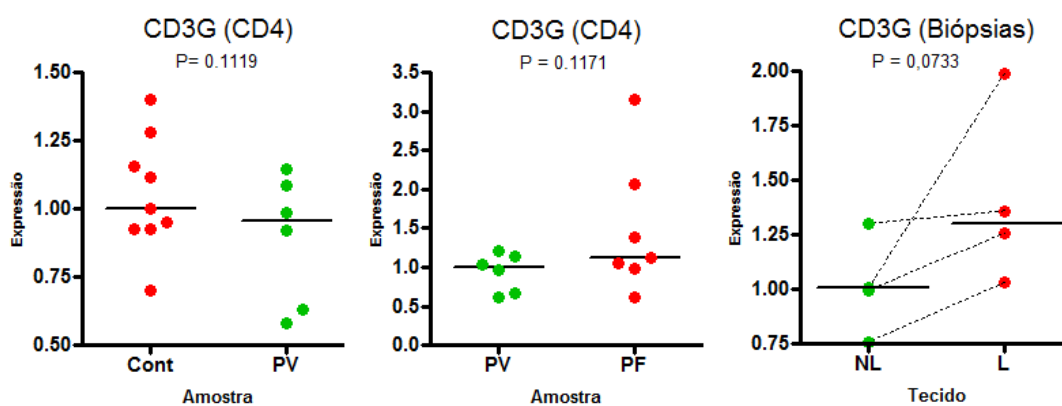


Figura 24. Expressão gênica do gene *CD3G* em linfócitos T $CD4^+$ nos diferentes subgrupos amostrais comparados (A e B) e em biópsias de pele (C).

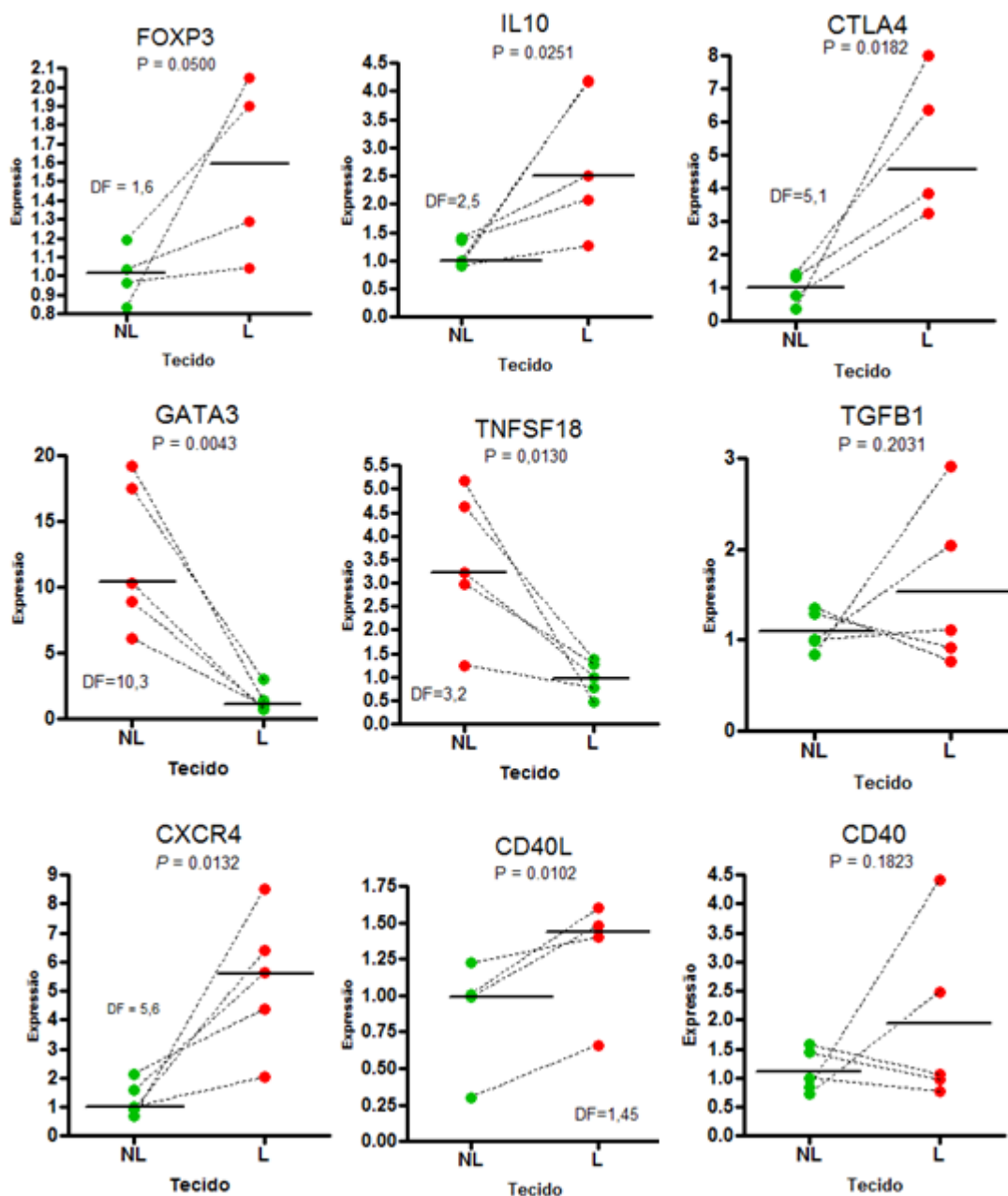


Figura 25. Expressão gênica diferencial dos genes *FOXP3*, *IL10*, *CTLA4*, *GATA3*, *TNFSF18*, *TGFB1*, *CXCR4*, *CD40L* e *CD40* em biópsias de pele de pacientes com pênfigo foliáceo.

De todos os genes analisados por PCR-RT apenas para *CD3G* e *DNAJB1*, e para uma das comparações envolvendo os genes *CD1D* e *CDA* (GenST x GenT) não foram obtidas diferenças significantes do ponto de vista estatístico como os encontrados pela análise em microarranjos. As demais comparações envolvendo os genes *CD1D* e *CDA* foram confirmadas estatisticamente. Portanto, há uma concordância entre os dados de microarranjos e PCR-RT, pois mesmo para os genes citados acima, para os quais os valores de *P* ficaram acima do limiar estabelecido como significativo, foi verificada uma tendência na mesma direção à encontrada nos microarranjos, ou seja, não houve discrepância entre os resultados obtidos pelas duas metodologias de análise de expressão gênica. A Figura 26 e a Tabela 6 são complementares e resumizam estes resultados.

Como os resultados da PCR-RT correlacionaram bem com a expressão gênica diferencial obtida com os microarranjos, considerou-se que a qualidade dos resultados é boa e que os dados de expressão gênica derivados dos microarranjos são confiáveis, permitindo-nos discuti-los de maneira geral.

Com relação às análises entre os tecidos lesionado e não-lesionado, encontrou-se expressão gênica diferencial para os seguintes genes: *CD1D*, *CDA*, *LGALS3*, *LILRB2*, *LYZ*, *NKG7*, *CTLA4*, *IL10*, *IL4*, *GATA3*, *FOXP3*, *CXCR4* e *CD40L* (Figuras 10, 12, 15, 19, 21, 22, 25).

Não houve expressão gênica diferencial entre o tecido lesionado e o não-lesionado para os seguintes genes: *CX3CR1*, *DNAJB1*, *CD3G*, *GZMA*, *GZMH*, *IFI30*, *LGALS1*, *TNFSF13B*, *TGFβ1* e *CD40* (Figuras 11, 23, 24, 16, 17, 13, 14, 20, 25). Entretanto, para os genes *TNFSF13B* e *IFI30* há uma perceptível tendência de aumento da expressão destes genes no tecido lesionado.

Figura 26. Comparação entre os resultados de quantificação da expressão gênica obtidos por PCR em tempo real e por microarranjos.

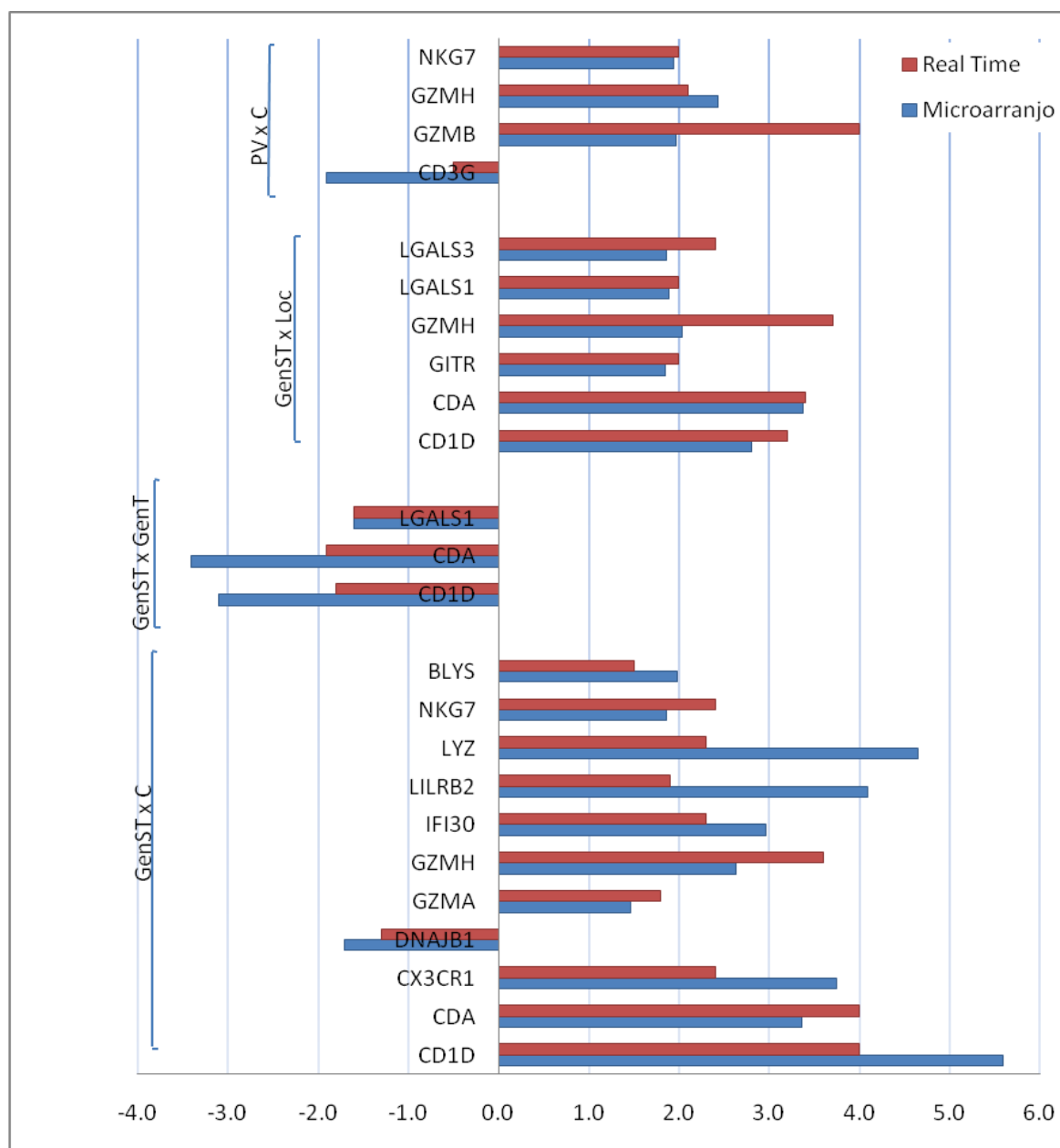


Figura 26. Comparação entre os resultados de quantificação da expressão gênica obtidos por PCR em tempo real e por microarranjos para os genes analisados em cada comparação, mostrando a elevada concordância entre as duas metodologias. C: controles; Gen ST: pacientes com a forma generalizada de pênfigo foliáceo e sem tratamento; Gen T: pacientes com a forma generalizada de pênfigo foliáceo com tratamento imunossupressor; Loc: pacientes com a forma localizada de pênfigo foliáceo; PV: pacientes com pênfigo vulgar.

Tabela 6. Resultados de quantificação da expressão gênica obtidos por PCR em tempo real e por microarranjos para os genes analisados em cada comparação. C: controles; Gen ST: pacientes com a forma generalizada de pênfigo foliáceo e sem tratamento; Gen T: pacientes com a forma generalizada de pênfigo foliáceo com tratamento imunossupressor; Loc: pacientes com a forma localizada de pênfigo foliáceo; PV: pacientes com pênfigo vulgar. DF: diferença de expressão; *P*: valores de probabilidade.

[illegible]

6. DISCUSSÃO

Há um número aumentado de células T CD4⁺ em biópsias de pele de tecido lesionado de pacientes quando comparadas ao tecido não-lesionado (SANTI e SOTTO, 2001), além de outros dados na literatura que sustentam um papel patogênico para este tipo de célula no pênfigo. Estas constatações enfatizam a importância destas células e indicam que vários dos genes envolvidos na patogênese da doença possivelmente são expressos em células T CD4⁺. Por isso escolheu-se esta população celular para ser estudada através de análise de expressão gênica em larga escala com microarranjos que tem se mostrado muito útil na compreensão da patogênese de doenças autoimunes. Várias comparações entre diferentes subgrupos de pacientes e controles foram feitas e muitos dados relevantes para a compreensão do mecanismo autoimune foram encontrados.

Devido à impossibilidade de se discutir a respeito de todos os genes encontrados como diferencialmente expressos, optou-se, para o presente trabalho, por discutir aqueles cuja expressão diferencial foi confirmada por PCR-RT e outros que possam ter algum papel relevante na doença, selecionados pelo fato de haver indícios, a partir de dados publicados para outras doenças, de que pudessem exercer um papel nas doenças autoimunes. Salienta-se que todos os demais genes, incluindo-se aqueles genes codificadores de proteínas hipotéticas ou sem função conhecida e que foram excluídos da análise neste momento, serão objetos de estudo em análises posteriores a este trabalho.

6.1. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sem tratamento imunossupressor em relação aos controles

As células T CD4⁺ podem ser divididas em dois subconjuntos – Th1 e Th2, de acordo com o perfil de citocinas que produzem. O pênfigo tem sido associado com uma predominância de citocinas Th2, contribuindo para altos níveis de IgG4 e níveis mais brandos de IgG1. Entretanto, neste trabalho não foi detectada expressão diferencial de genes codificadores de fatores de transcrição que são clássicos marcadores de células Th2, tais como *GATA-3*, *NFATc* ou *STAT6*, nos pacientes com a forma generalizada do pênfigo

sem tratamento em relação aos controles. Isto pode ser devido ao fato de que células Th2 geralmente circulam em baixo número e, consequentemente os genes associados com Th2 estejam pouco abundantes. Outra possibilidade é que estes genes não tenham aparecido com expressão aumentada por não satisfazerem os critérios arbitrários predeterminados para o estabelecimento de expressão gênica diferencial – $P < 0,01$ e diferença de expressão maior ou igual a 1,5 vezes. Ainda, é importante ressaltar que a maioria dos estudos de expressão gênica em linfócitos é realizada *in vitro*, com linhagens de células em cultura. São muito poucos os estudos como o realizado neste trabalho, com células T periféricas não estimuladas, cujos constituintes moleculares foram mantidos em condições o mais similares possíveis com as existentes *in vivo*. Nesses poucos estudos, nos quais células T CD4⁺ de pacientes com dermatite atópica e asma foram isolados do sangue periférico e analisados com microarranjos também não foi observada expressão diferencial de genes classicamente envolvidos com a polarização Th2 (HIJNEN *et al.*, 2005; HANSEL *et al.*, 2005; KAPITEIN *et al.*, 2008). No entanto, no presente trabalho, encontrou-se expressão aumentada de vários genes envolvidos na ativação de células T, proliferação e migração nos linfócitos T CD4 de pacientes e isto sustenta a noção de que o pênfigo é uma doença sistêmica e que linfócitos T CD4⁺ ativados recirculam do sangue periférico para a pele durante a reação inflamatória. Estes vários genes são descritos e seus possíveis papéis no processo patogênico da doença são discutidos abaixo.

As moléculas CD1 compreendem uma família de proteínas que são estruturalmente relacionadas às proteínas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). CD1D é expresso principalmente por células B, monócitos e timócitos. Entretanto, níveis baixos de *CD1D* foram encontrados em células T ativadas (EXLEY *et al.*, 2000). Estas moléculas ligam antígenos glicolipídicos e os apresentam para células T *natural killer* (T NK). As células T NK constituem uma população de linfócitos CD4⁺ que exhibe marcadores de superfície característicos de células T e NK e encontram-se na interface entre as imunidades inata e adaptativa. As células T NK moldam uma ampla variedade de respostas imunes: controlam a destruição de tecidos, autoimunidade, respostas antitumorais, defesa do hospedeiro a agentes agressores e inflamação (NIEMEYER *et al.*, 2007). A ativação destas células pode ter consequências benéficas, como a prevenção de diabetes em modelos animais, sendo mediada por células T NK restritas por CD1D

(DUARTE *et al.*, 2004), ou danosas, causando um aumento da inflamação nas articulações por suprimir a produção de *TGFβ1* (KIM *et al.*, 2005). Quando estimuladas, as T NK podem elicitar uma resposta predominantemente Th1 ou Th2, dependendo do antígeno glicolípido utilizado. Recentemente, NIEMEYER *et al.*, (2007) demonstraram que estas células podem também evoluir para um fenótipo de células T reguladoras produtoras de interleucina 17 (IL17). Com relação ao pênfigo, a expressão de *CD1D* esteve mais elevada em linfócitos de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sem tratamento quando comparado aos controles, e também quando comparado aos pacientes com a forma localizada da doença (Figura 10). Apesar da diferença de expressão não ter significância estatística na PCR-RT, nos pacientes sob tratamento imunossupressor a expressão de *CD1D* esteve diminuída em relação aos pacientes sem tratamento. Nas biópsias, a expressão desse gene esteve aproximadamente 4 vezes mais elevada no tecido lesionado de pacientes quando comparado ao tecido não-lesionado dos mesmos. Em conjunto, estes dados indicam um papel de *CD1D* na patogênese do pênfigo. Mais que isto, indicam a possibilidade de células T NK e antígenos lipídicos também participarem do processo patogênico. Até o momento não há qualquer descrição do envolvimento destas células em qualquer das formas clínicas de pênfigo. Especulando-se sobre o possível papel desta molécula na doença, no sangue periférico as células T NK ativadas podem estar contribuindo para a polarização das células T para uma resposta Th2, enquanto que no tecido lesionado pode contribuir para a supressão da resposta autoimune.

CX3CR1 é um receptor de quimiocina (fractalquina), expresso principalmente por células NK, mas também por células T CD4, T CD8 e monócitos (GARIN *et al.*, 2003). O tráfego de leucócitos do endotélio para os tecidos alvos requer moléculas de adesão e fatores quimiotáticos. Fractalquina existe em duas formas, a ligada à membrana e a solúvel, e induz tanto a adesão quanto a migração de leucócitos, sendo que seu receptor, CX3CR1, medeia essas funções. OLSSON *et al.* (2008) analisaram genes e proteínas envolvidas no tráfego de células T usando microarranjos e citometria de fluxo em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática, uma doença autoimune na qual as plaquetas são destruídas prematuramente no baço, fígado e medula óssea. Neste estudo foi encontrada uma expressão aumentada de *CX3CR1* em células T periféricas de pacientes e baseados em dados de vários ensaios os autores concluíram que a expressão aumentada de

CX3CR1 sozinha é um sinal quimiotático suficiente para o tráfico de células T do sangue periférico para a medula óssea. Em pacientes asmáticos, níveis elevados de *CX3CR1* foram encontrados em biópsias de tecido brônquico e em linfócitos T CD4⁺ periféricos quando comparados aos controles (LAPRISE *et al.*, 2004; WOHLFAHRT e KUNZMANN, 2003). No pênfigo, não houve diferença de expressão de *CX3CR1* quando comparados o tecido lesionado e não-lesionado de pacientes, mas a expressão deste gene está aumentada em linfócitos T CD4⁺ tanto de pacientes com pênfigo foliáceo, quanto de pacientes com pênfigo vulgar em comparação aos controles (Figura 11). Sendo assim, é possível que a expressão elevada de *CX3CR1* nos linfócitos T CD4⁺ periféricos esteja relacionada ao estado ativado dessas células, fazendo com que estas adquiram, entre outras propriedades, uma maior capacidade de mobilidade.

Foi observada expressão diferencial de vários outros genes envolvidos com adesão e migração de linfócitos nos pacientes com pênfigo. Estes incluem genes implicados em adesão celular (*CD9*, *CD33* e *GCA*, *FCGR1A*) e organização do citoesqueleto (*RAC1*) cujas expressões estão aumentadas (Tabela 2). *CD9* e *CD33* também são marcadores expressos por linfócitos ativados (CARIAPPA *et al.*, 2005; CROCKER, 2005). Níveis elevados de *GCA* (grancalcina) foram encontrados em leucócitos infiltrados em sítios infectados por bactérias, o que implica sua função nas respostas inflamatórias (LIU *et al.*, 2004). *FCGR1A* (receptor para fragmento Fc de IgG, [CD64]) é uma molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas e funciona como um ligante para as integrinas.

Genes envolvidos na proliferação celular (*RAB31*, *RAB32*, *TNFSF9*, *TNFSF10* e *TNFSF13B*) também foram encontrados como diferencialmente expressos (Tabela 2). Genes pertencentes à família de oncogenes RAS (*RAB31* e *RAB32*) estiveram com expressão aumentada nos pacientes com pênfigo foliáceo e vulgar, respectivamente. A ativação de genes RAS tem sido implicada na polarização das células T para um perfil Th2 em um modelo murino (SHIBATA *et al.*, 2002). *TNFSF9* (membro 9 da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral), também conhecido como 4-1BB é expresso em células T CD4⁺ ativadas e acentua a expansão e produção de citocinas por estas células quando engajado pelo seu receptor, sobre as células apresentadoras de antígenos (CANNONS *et al.*, 2001). Além disso, *TNFSF9* está envolvido na produção de anticorpos pelas células B e promove sobrevivência das células T (HURTADO *et al.*, 1997).

TNFSF10 (membro 10 da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral), também está envolvido com sobrevivência aumentada de células T. Especificamente, foi demonstrado num modelo animal de lúpus, que TNFSF10 sustenta o número de células T CD4⁺ efectoras, as quais provêem auxílio para as células B produzirem autoanticorpos acentuando, dessa maneira, a gravidade da doença (RUS et al., 2007). Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico têm expressão gênica elevada de *TNFSF10* (RUS et al., 2002). Entretanto, um estudo recente tem sugerido que células T reguladoras ativadas induzem apoptose de células T efectoras através de TNFSF10 (REN et al., 2007).

TNFSF13B é um membro da família de ligantes do fator de necrose tumoral, expresso sobre macrófagos, monócitos, células dendríticas e células T. Como outros membros da família TNF, existe na forma ligada à membrana e na forma solúvel. Também conhecido como BLYS (estimulador de linfócitos B), é crítico para a sobrevivência, maturação e tolerância das células B na periferia e tem papel importante na indução da produção de imunoglobulinas pelas células B. Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e síndrome de Sjögren têm níveis séricos de TNFSF13B mais elevados quando comparados com indivíduos saudáveis (ZHANG *et al.*, 2001; GROOM *et al.*, 2002; CHEEMA *et al.*, 2001). Utilizando imunohistoquímica, LAVIE *et al.*, (2004) demonstraram que a expressão de TNFSF13B está aumentada em linfócitos T que compõem o infiltrado inflamatório das glândulas salivares de pacientes com síndrome de Sjögren e concluíram que TNFSF13B expresso por células T no órgão alvo da resposta autoimune pode ter um papel na patogênese da doença, levando à ativação de células B autorreativas. No presente trabalho, a expressão de *TNFSF13B* esteve aumentada em pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em comparação com os controles e diminuída em pacientes submetidos a tratamento imunossupressor (Figura 20). Apesar do valor de probabilidade ter ficado acima do limiar de significância estatística, há uma tendência na direção de um aumento da expressão de *TNFSF13B* no tecido lesionado (Figura 20B). Estes resultados, juntamente com os encontrados para outras doenças autoimunes, são condizentes com um papel de *TNFSF13B* na patogênese do pênfigo foliáceo.

É possível que linfócitos T CD4 expressando níveis elevados de *TNFSF9*, *TNFSF10*, *TNFSF13B* possam ativar células B autorreativas ou comprometer a capacidade dessas

células em responderem a sinais apoptóticos, ou seja, podem estar sustentando a produção de autoanticorpos por estas células, tanto na periferia quanto no tecido alvo. Ainda, a diminuição da expressão de *TNFSF13B* em pacientes sob tratamento imunossupressor levanta a possibilidade de essa molécula ser um alvo molecular para terapia.

Classicamente, as granzimas são tidas como expressas por linfócitos T CD8 e células NK, as quais têm atividade citotóxica. Entretanto, muitas células T CD4⁺ humanas exibem atividade citotóxica (LIEBERMAN, 2003). Recentemente, HIDALGO *et al.* (2008) utilizando microarranjos, demonstraram que a expressão de transcritos é muito similar entre linfócitos citotóxicos CD8⁺ e CD4⁺ e destes com os de células NK, sendo que os transcritos das granzimas e perforinas foram compartilhados por estes três tipos celulares, apesar de a expressão mais elevada dos mesmos se dar em células NK. A principal função dos linfócitos citotóxicos é a eliminação de células modificadas por apoptose. Na autoimunidade, linfócitos citotóxicos potencialmente podem eliminar células B autorreativas ativadas (RUS *et al.*, 2007). Inclusive, as granzimas A e B são expressas por células T reguladoras, as quais podem exercer seu efeito supressor eliminando células alvo através da liberação destas granzimas (GROSSMAN *et al.*, 2004; GONDEK *et al.*, 2005). A apoptose é induzida por duas vias principais, a via FAS/FASL ou através da exocitose de grânulos especializados - granzimas, perforinas e granulisinias. No presente trabalho, as granzimas estiveram com expressão aumentada em linfócitos T CD4⁺ dos pacientes em várias comparações (Figuras 16-18). Expressão de *GZMH* (granzima H) está mais elevada em pacientes com pênfigo foliáceo e vulgar em relação aos controles e, em pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos pacientes com a forma localizada. Expressão de *GZMA* (granzima A) está mais elevada em pacientes com pênfigo foliáceo em relação aos controles e a expressão de *GZMB* (granzima B) e *GNLY* (granulisinina) está aumentada em pacientes com pênfigo vulgar em relação aos controles. O papel do desbalanço de moléculas relacionadas a apoptose (FAS, FASL, BAX, BCL-2, caspases) na indução do pênfigo já foi demonstrado (PUVIANI *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004; ARREDONDO *et al.*, 2005). Já a participação de linfócitos citotóxicos desencadeando apoptose não foi sugerida até a presente data. Os resultados aqui encontrados são indicativos de que a citotoxicidade possa ter papel na patogênese da doença, mas como não foi encontrada expressão diferencial destes genes nas biópsias de tecido lesionado e não-

lesionado, isto precisa ser mais bem investigado. O fato de a *GZMH* estar mais expressa nos pacientes com a forma generalizada do que nos pacientes com a forma localizada sugere que este gene pode estar relacionado não só com o início, mas também com a intensidade da resposta e consequente agravamento da doença. *GZMH* é considerada uma granzima “órfã” uma vez que suas funções biológicas ainda são pouco conhecidas. A demonstração de que esta também é capaz de induzir morte celular é muito recente (FELLOWS *et al.*, 2007). Este fato é mais um incentivo para futuros estudos envolvendo granzimas, em particular a *GZMH*, na indução ou agravamento do pênfigo. Ainda, além da função clássica na indução da apoptose, as granzimas também tem sido implicadas no remodelamento da matriz celular e migração de linfócitos para o sítio alvo da resposta imune (BUZZA *et al.*, 2005). Uma molécula essencial e requerida para o processamento e ativação das granzimas A, B e H é a catepsina C (CTSC). A expressão da *CTSC* também está aumentada nos pacientes (Tabela 2), sendo um indicativo a mais do envolvimento da imunidade celular mediada por linfócitos citotóxicos na patogenia do pênfigo. Expressão aumentada de *CTSC* foi encontrada em biópsias de tecido brônquico de pacientes asmáticos quando comparados aos controles (LAPRISE *et al.*, 2004). A granulisina é um gene expresso somente após ativação das células T e é liberado após engajamento do TCR (PENA *et al.*, 1997). Portanto, a granulisina também é um marcador de células T ativadas.

LILRB2 (receptor 2 de leucócitos semelhante a imunoglobulina) é um receptor inibidor expresso predominantemente sobre monócitos e células B e em níveis mais baixos em células NK e dendríticas. A expressão desse gene não foi verificada em linfócitos T até o momento e, surpreendentemente, a expressão de *LILRB2* esteve aumentada em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em comparação com os controles. Isto pode ser sugestivo de contaminação por monócitos, uma vez que esta população celular também expressa o receptor CD4. Entretanto, é preciso ter cautela em se afirmar que determinado gene não é expresso em determinada população celular. É muito comum concluir-se que certo gene é expresso num determinado tipo celular, mas não em outro ou então que tem uma única função e depois constatar-se que o leque de expressão e funções é muito mais amplo. De fato, isso é mesmo esperado, porque cada estudo se limita a analisar certos tipos celulares sob certas condições, apenas. O gene *TNFSF13B* citado acima, era tido como expresso exclusivamente por células apresentadoras de antígenos. No

entanto, foi inesperadamente verificado que células T expressam esse gene em altos níveis no tecido alvo da autoimunidade (LAVIE *et al.*, 2004). Outro indicativo de que células T podem expressar *LILRB2* é o fato de *LILRB2* ter sido encontrado diferencialmente expresso em linfócitos T CD4⁺ periféricos de crianças com dificuldades respiratórias (KAPITEIN *et al.*, 2008). Ainda, as populações de linfócitos T CD4⁺ isoladas para os ensaios foram extremamente puras, com aproximadamente 97% das células isoladas sendo CD3⁺/CD4⁺. Os monócitos não expressam o receptor CD3. Entretanto, apesar de consideramos as outras explicações muito mais verossímeis, não é possível excluir a possibilidade de que os 3% de células contaminantes tenham algum impacto sobre os resultados. Há um aumento significativo de quase 5 vezes da expressão de *LILRB2* no tecido lesionado em comparação com o não lesionado. Isto pode refletir a presença de monócitos e/ou células NK e/ou células dendríticas no tecido lesionado (Figura 19B). *LILRB2* é um receptor que quando estimulado gera uma cascata de sinais inibitórios. Utilizando linhagens de células T supressoras CD8⁺/CD28⁻, CHANG *et al.*, (2002) demonstraram por citometria de fluxo que a expressão de *LILRB2* está aumentada sobre monócitos e células dendríticas. Isto é sugestivo de que a expressão aumentada de *LILRB2* no tecido lesionado de pacientes com pênfigo possa refletir uma resposta inicial do organismo para tentar conter a resposta autoimune.

NKG7 (grupo 7 das células NK) é uma proteína de membrana expresso sobre células T e NK ativadas e pode regular a função efetora das células T (MEDLEY *et al.*, 1996). Conhece-se pouco sobre os mecanismos e função de NKG7 sobre as células T CD4⁺. O fato de a expressão de *NKG7* estar aumentada em pacientes com pênfigo foliáceo e vulgar em relação aos controles e, também nas biópsias de tecido lesionado quando comparadas ao de tecido não-lesionado (Figura 22) é indicativo de algum papel deste gene no processo patogênico do pênfigo. Dando mais sustentação a este papel está o fato de *NKG7* estar também mais expresso em pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos pacientes com a forma localizada, indicando que *NKG7* pode estar contribuindo também para a intensificação do processo autoimune e consequente agravamento da doença. Recentemente, RIFAI e DWORKIN (2008) encontraram células NKG7⁺ no infiltrado leucocitário renal de pacientes com nefropatia de IgA e verificaram que estas células são marcadores da progressão da doença. A constatação destes autores aliado aos

dados do presente trabalho são um incentivo a futuros estudos sobre este gene, bem como do seu papel na autoimunidade.

IFI30 (proteína 30 induzível por IFNG) é uma proteína da família das tiol redutase lisossomais, capaz de reduzir pontes dissulfeto. É constitutivamente expresso por células apresentadoras de antígenos, mas é induzível em outros tipos de células por citocinas inflamatórias, como o IFNG. IFI30 está envolvido nos primeiros passos do processamento de antígenos protéicos para sua clivagem proteolítica a apresentação dos peptídeos resultantes por moléculas MHC de classe II aos linfócitos. Até pouco tempo essa era a única função conhecida para IFI30 e, portanto, imaginava-se que apenas células apresentadoras de antígenos expressassem IFI30. Entretanto, BARJAKTAREVIC *et al.* (2006) demonstraram que IFI30 é expresso constitutivamente em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e tem uma função não relacionada com apresentação de antígenos. Ao compararem a ativação de células T *in vitro* deficientes em *IFI30* com células T não-deficientes foi verificado que estas células respondem de uma maneira muito mais acentuada na ausência de *IFI30*. Portanto, *IFI30* tem um efeito negativo sobre o processo de ativação das células T. Surpreendentemente, uma molécula com localização lisossomal suprime a ativação de células T, um processo caracterizado por transdução de sinal da membrana plasmática para o citoplasma e núcleo. Nos pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo e sem tratamento, a expressão de *IFI30* está aumentada em relação aos controles (Figura 13A). Já nas biópsias, embora acima do limiar de significância estatística, há uma tendência de aumento da expressão de *IFI30* no tecido lesionado (Figura 13B). Devido ao seu papel, é possível que o aumento da expressão de *IFI30* tanto em células T periféricas quanto do sítio lesionado possa modular negativamente a função das células T, ou seja, pode ser uma resposta inicial de defesa do organismo contra a resposta inflamatória. Níveis de expressão gênica mais elevada de *IFI30* foram encontrados em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com dermatite atópica, um distúrbio inflamatório da epiderme, quando comparados aos controles (HIJNEN *et al.*, 2005). Com estas evidências, é provável que *IFI30* participe do processo patogênico do pênfigo.

A diferença de expressão encontrada para *LYZ* (lisozima) em linfócitos de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo quando comparados aos controles aparentemente ocorre em apenas parte dos pacientes, por motivos a serem esclarecidos,

pois para apenas 3 indivíduos a expressão esteve realmente elevada em comparação com os controles (Figura 21A). O mesmo ocorreu para os genes *DNAJB1* e *CD3G*, para os quais não foram obtidas diferenças significantes do ponto de vista estatístico como os encontrados pela análise em microarranjos. Já nas biópsias parece que aumento da expressão de *LYZ* no tecido lesionado ocorre em todos os pacientes (Figura 21B). A *LYZ* catalisa a hidrólise de certos mucopolissacarídeos da parede celular de bactérias, dissolvendo essas paredes e é expressa em grande número de tecidos. Níveis elevados de *LYZ* foram encontrados no soro e sinóvia de pacientes com artrite reumatóide (TORSTEINSDOTTIR *et al.*, 1999). A expressão aumentada de *LYZ* no tecido lesionado pode estar refletindo a presença de células fagocíticas, que são as que expressam *LYZ* em níveis mais elevados. Apesar de terem sido excluídos da amostra pacientes que estivessem com infecções secundárias nas lesões, é possível que o aumento de *LYZ* esteja refletindo uma resposta a uma infecção inicial e não visível em algumas amostras. Se há algum outro papel para *LYZ* no processo patogênico do pênfigo, este ainda precisa ser explorado.

Um fato que merece ser ressaltado, é que 9 (7%) dos genes encontrados como diferencialmente expressos (*NALP12*, *FPR1*, *LILRB2*, *LIR9*, *CD33*, *LAIR*, *RASGRP4*, *NKG7* e *FCGBP*) estão localizados na região genômica 19q13. É possível que esta seja uma região portadora de genes de susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. Isto serve de incentivo para que futuros estudos sejam direcionados para explorar esta região.

6.2. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sob tratamento imunossupressor em comparação aos linfócitos de pacientes sem tratamento

Os glicocorticóides (GCs) são potentes inibidores de respostas imunes através da regulação de citocinas e causando apoptose de timócitos imaturos. São as principais drogas utilizadas na terapia de pacientes com pênfigo, sendo que o mais amplamente utilizado é a prednisona na dose de 1 mg/Kg/por dia, com ou sem outros agentes imunossupressores, como a azatioprina.

A expressão de muitos genes pode ser regulada pelos corticóides, que podem fazer uma regulação positiva ou negativa dos genes responsivos. Os efeitos farmacológicos dos corticóides resultam da exposição dos seus receptores a concentrações suprafisiológicas do

ligante. Os níveis anormalmente elevados da ligação aos receptores dos glicocorticóides produzem respostas exageradas, as quais possuem efeitos benéficos, mas também tóxicos. Considerando-se o grande número de genes regulados pelos corticóides e que diferentes genes são regulados em diferentes tecidos, os efeitos dos corticóides são sistêmicos e muito complexos.

O efeito do uso de imunossupressores, mais precisamente glicocorticóides, sobre a expressão gênica de linfócitos periféricos não é completamente entendido. Neste trabalho, utilizou-se microarranjos para identificar novos genes alvos dos glucocorticóides em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com pênfigo foliáceo sem tratamento em relação aos pacientes sob tratamento, com o objetivo de identificar possíveis alvos terapêuticos mais específicos para futuras análises farmacogenéticas. Note-se que como todos os pacientes sob tratamento estavam com lesões ativas, encontrou-se os alvos iniciais da corticoterapia.

Nas análises do presente trabalho, muitos genes tiveram sua expressão diminuída. Dentre eles *CD1D* e *TNFSF13B* foram discutidos anteriormente e, *TNFSF13B*, devido ao que se sabe até agora sobre sua função e papel em outras doenças autoimunes, parece ser promissor como alvo de uma terapia mais específica.

A azatioprina é convertida *in vivo* em um antagonista das purinas, que interfere na síntese do DNA e é tóxico para as células em divisão. Um efeito semelhante ao da azatioprina é o da citidina desaminase (CDA), cujo gene foi encontrado com expressão diminuída nos pacientes sob tratamento. CDA (citidina desaminase) é uma enzima que irreversivelmente desamina a citidina e desoxicitidina para uridina, interferindo no processo de replicação do DNA. Níveis elevados de CDA estão associados com sobrevivência celular diminuída (GRAN *et al.*, 1998). CDA também catalisa a inativação de nucleosídeos quimioterápicos análogos da citosina - arabinosida (Ara-C), 5-azacitidina, e 2,2-difluorodeoxicitidina (gemcitabina), o que resulta em perda da atividade citotóxica e antitumoral desses quimioterápicos. Resistência clínica a Ara-C é um dos principais problemas no tratamento da leucemia mielóide aguda e esta tem sido atribuída à atividade aumentada da CDA. Com relação ao pênfigo, a expressão de *CDA* esteve mais elevada em linfócitos de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sem tratamento quando comparados aos controles, e também quando comparados aos pacientes com a forma localizada da doença (Figura 12). Apesar de não haver significância estatística

da diferença de expressão verificada na PCR-RT, nos pacientes sob tratamento imunossupressor a expressão de *CDA* esteve diminuída em relação aos pacientes sem tratamento. Nas biópsias, a expressão desse gene esteve mais elevada no tecido lesionado de pacientes quando comparado ao tecido não-lesionado dos mesmos. O papel da *CDA* na autoimunidade ainda não foi explorado. Níveis de expressão gênica mais elevada de *CDA* foram encontrados em neutrófilos de pacientes com artrite reumatóide juvenil poliarticular (JARVIS *et al.*, 2006). Em conjunto, estes dados indicam que *CDA* tem potencial para ser explorado como imunossupressor para terapia do pênfigo.

Dois genes envolvidos com produção de IgE foram encontrados com expressão diminuída - *FCER2* e *FCER1G* (Tabela 3). *FCER2* codifica a molécula CD23, a qual é o receptor de baixa afinidade para o fragmento Fc de IgE e tem papel fundamental na ativação e proliferação das células B. Já foi demonstrado o efeito dos corticóides na diminuição da expressão de *FCER2* (PATERSON *et al.*, 1994). A diminuição da expressão de *FCER2* resulta em níveis mais elevados de IgE, o que é um complicador das doenças alérgicas (TANTISIRA *et al.*, 2007). Já *FCER1G* é o receptor de alta afinidade para o fragmento Fc de IgE. LOCK *et al.* (2002) identificaram vários genes que são diferencialmente expressos entre lesões e tecido normal de pacientes com esclerose múltipla (EM), bem como genes que diferenciam lesões crônicas e agudas. Identificados estes genes, alguns foram escolhidos como alvos terapêuticos potenciais e testados em modelos murinos de EM. Os genes para o receptor Fc de IgE tiveram expressão elevada em lesões crônicas. A comparação da gravidade da doença entre camundongos deficientes para o receptor Fc e selvagens, mostrou que a doença aguda foi menos grave e a doença crônica esteve ausente em camundongos carentes da expressão do receptor. Este resultado é um indicativo de que estes receptores são alvos em potencial para o tratamento de doenças autoimunes e se isso se dá através de um aumento da expressão de IgE e se tem algum efeito benéfico para o pênfigo precisa ser mais bem investigado.

Efeitos conhecido dos corticóides são a inibição da apoptose. Neste contexto, foi encontrada a expressão diminuída de *BCL2A1*, que codifica uma proteína pró-apoptótica.

ITGAX (integrina alfa), *FUT7* (fucosiltransferase 7) e *MMP19* (metaloproteinase de matriz 19) são genes envolvidos com adesão e migração de leucócitos e também tiveram suas expressões diminuídas (Tabela 3). O corticóide parece exercer parte do seu efeito

diminuindo a expressão de moléculas envolvidas com adesão, o que pode levar a uma mobilidade diminuída e consequente diminuição da infiltração de linfócitos na pele.

6.3. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo em comparação aos linfócitos de pacientes com a forma localizada da doença

As alterações moleculares que diferenciam a intensidade das respostas imunológicas em subgrupos de pacientes que manifestam as formas localizada e generalizada da doença não são conhecidas. A expressão aumentada de genes em pacientes com a forma generalizada da doença em relação aos pacientes com a forma localizada da doença pode ser um indicativo de que o produto destes genes pode estar atuando na intensificação da resposta autoimune. Da mesma maneira, genes com expressão aumentada em pacientes com a forma localizada da doença podem estar atuando na diminuição da intensidade da resposta imune.

De todos os genes identificados como diferencialmente expressos nesta comparação, chamam atenção os codificadores das galectinas. Galectinas fazem parte da família de lectinas com afinidade para β -galactosídeos. As galectinas têm uma ampla variedade de funções e papéis importantes na regulação das respostas imunes e inflamatórias. Existe um amplo espectro de funções atribuídas às galectinas e estas podem variar dependendo do tipo de célula e local no qual a mesma está sendo expressa. As galectinas existem na forma ligada à membrana e na forma solúvel e, sendo assim, podem atuar intra- ou extracelularmente. Extracelularmente são capazes de ligar glicoproteínas e glicolipídeos e podem afetar o crescimento e morte celular, ativar ou inibir respostas celulares, promover ou inibir adesão influenciando a migração celular. Intracelularmente, podem regular o crescimento e sobrevivência por interagir com proteínas nucleares e citoplásmicas, através de interações proteína-proteína, afetando, portanto, as vias de sinalização intracelular. Dos 15 genes codificando galectinas em humanos, três estão diferencialmente expressas nos linfócitos T CD4⁺ de pacientes com pênfigo – *LGALS1* (galectina 1), *LGALS3* (galectina 3) e *LGALS12* (galectina 12). Em células T CD4⁺, as galectinas 1 e 3 são expressas apenas após sua ativação. Assim sendo, *LGALS1* e *LGALS3* são marcadores de células T ativadas.

As funções extracelulares das galectinas têm sido mais amplamente estudadas e demonstradas através da adição de galectinas recombinantes às culturas de células. Galectina 1 tem uma função supressora sobre as células T ativadas, aumentando a apoptose destas células e, diminuindo a ativação e a adesão à matriz extracelular. A galectina 3 tem um duplo papel, protegendo as células T da apoptose quando presente intracelularmente ou induzindo apoptose quando atua sobre as células T no espaço extracelular (RABINOVICH *et al.*, 2007). Na verdade, ambas galectina 1 e 3 podem ter efeitos positivos ou negativos sobre a ativação das células do sistema imune, dependendo do tipo de célula e sítio no qual estão localizadas. Com relação à *LGALS12*, muito pouco é conhecido sobre sua função. Até o momento, sabe-se que este gene é expresso e atua sobre a regulação do ciclo celular em adipócitos (YANG *et al.*, 2001). No caso do presente trabalho, o fato de encontrar-se expressão intracelular aumentada de *LGALS1*, *LGALS3* e *LGALS12* em linfócitos T de pacientes é indicativo de que estas galectinas podem estar protegendo estas células da apoptose. Portanto, mais do que atuar em estágios iniciais do processo autoimune no pênfigo, produto destes genes pode estar atuando na intensificação da resposta autoimune.

Três genes do MHC estiveram com expressão aumentada nos pacientes com a forma generalizada (Tabela 4). *HLA-DMA* e *HLA-DMB* codificam as cadeias alfa e beta das moléculas HLA-DM e, *HLA-DPBI* codifica a cadeia beta da molécula HLA-DP. Ao contrário das demais moléculas HLA, HLA-DM não é expresso na superfície celular, mas é encontrado nos endossomos. As moléculas HLA-DM ligam e estabilizam outras moléculas MHC de classe II, que de outra forma, agregar-se-iam. Esta molécula também catalisa a liberação de peptídeos instáveis ligados às moléculas de classe II, removendo os que são instáveis e substituindo-os por outros. Os antígenos apresentados por moléculas MHC de classe II podem persistir na superfície das células apresentadoras de antígenos por alguns dias antes de encontrarem as células T capazes de reconhecê-los. Esta propriedade de HLA-DM garante que o complexo peptídeo:MHC sobreviva tempo suficiente para que ocorra a estimulação da célula T CD4 adequada. O aumento da expressão destas moléculas nos pacientes com a forma generalizada do pênfigo pode aumentar a quantidade de autoantígenos que está sendo apresentada, bem como aumentar o tempo de exposição dos mesmos, intensificando, desta maneira, os sintomas da doença nestes pacientes. A expressão de RNAm de moléculas de classe II já foi registrada no citoplasma de células T

ativadas (SANDILANDS *et al.*, 1999). PEREIRA *et al.* (2004) também registraram aumento da expressão destas moléculas em linfócitos T de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

CD33, *FUT7* (fucosiltransferase 7), *ADAM9* (desintegrina e metaloproteinase 9) e *ITGAM* (integrina alfa M) são todos genes que codificam moléculas mediadoras de migração celular e estão com expressão aumentada em pacientes com a forma generalizada da doença (Tabela 4). Sendo assim, estas moléculas podem contribuir para a migração mais efetiva de linfócitos para os sítios lesionados com consequente agravamento das lesões.

OS genes *CD1D*, *CDA*, *GZMH*, *NKG7* e *RAB31* estão também com expressão aumentada nos pacientes com a forma generalizada da doença. As funções e possíveis papéis destes genes foram discutidos anteriormente (Seções 6.1 e 6.2).

Digno de nota é o fato de 6 genes que codificam proteínas com motivo de dedo de zinco (*ZNF137*, *ZNF154*, *ZNF254*, *ZNF331*, *ZNF537* e *ZNF595*) que classicamente são envolvidas em regulação da expressão gênica por se ligarem ao DNA estejam com expressão diferencial. Destes, apenas *ZNF537* está com expressão aumentada nos pacientes com a forma generalizada da doença, todos os demais estão com expressão diminuída nessa forma da doença. Assim sendo, esses genes podem atuar como fatores responsáveis pelo abrandamento dos sintomas da doença, ou seja, podem diminuir a intensidade da resposta autoimune e merecem ser mais bem explorados, pois não existem ainda dados disponíveis sobre suas funções e alvos.

Com relação à região na qual mais genes diferencialmente estão localizados, a região genômica 19q13 novamente aparece contendo o maior número de genes – 8 (12%). São eles: *CD33*, *NKG7*, *LILRA1*, *LENG1*, *ZNF137*, *ZNF154*, *NALP12*, *ZNF331*.

6.4. Genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com pênfigo foliáceo e de pacientes com pênfigo vulgar

O mecanismo básico que contribui para a doença autoimune pode, em parte, ser compartilhado entre fenótipos relacionados. Sendo assim, o objetivo se identificar genes diferencialmente expressos entre os pacientes com pênfigo foliáceo quando comparados aos controles e que são compartilhados pelos pacientes com pênfigo vulgar quando

comparados aos controles, foi verificar se há uma base molecular comum entre as duas doenças, bem como quais genes estão contribuindo para cada fenótipo específico. Este tipo de abordagem pode também contribuir para a compreensão do mecanismo que leva à autoimunidade como um todo.

Foram encontrados 31 genes diferencialmente expressos compartilhados pelos dois fenótipos. São eles: *ABI3*, *APOL1*, *AQP9*, *CD1D*, *CD9*, *CLECSF9*, *CST7*, *CSTA*, *CX3CR1*, *DAF*, *DECRI*, *FCER1G*, *FCGR1A*, *GP1BB*, *GZMH*, *IFI30*, *IFITM3*, *KLRD1*, *LACTB*, *MGLL*, *MICL*, *MPRP1*, *NKG7*, *NPD014*, *POP4*, *RAB31*, *SESN1*, *SIAH1*, *SLC25A20*, *UBE2A*.

Aproximadamente, 30% dos genes encontrados como diferencialmente expressos em linfócitos T CD4 e possivelmente envolvidos na patogênese são compartilhados entre pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar, mostrando que estes dois fenótipos compartilham um mecanismo básico comum subjacente ao processo patogênico. Entretanto, apesar desse compartilhamento ser considerável, a maioria dos genes diferencialmente expressos é responsável pela especificidade de cada fenótipo.

As funções e possíveis implicações dos genes *CD1D*, *CD9*, *CX3CR1*, *GZMH*, *IFI30*, *NKG7* e *RAB31* na patogênese do pênfigo já foram discutidos em seções anteriores. O fato de estes genes estarem diferencialmente expressos nas duas formas clínicas de pênfigo reforça a possível participação dos mesmos no processo patogênico de ambas as doenças.

6.5. Genes diferencialmente expressos entre os tecidos lesionado e não-lesionado de pacientes com pênfigo foliáceo

Para todos os genes cuja expressão gênica diferencial foi confirmada por PCR-RT, avaliou-se também a expressão nos tecidos lesionado e não-lesionado de pacientes com pênfigo foliáceo e discutiu-se os resultados nas seções anteriores. Porém, além destes genes, foram analisados outros para os quais não foram encontradas diferenças de expressão nos linfócitos periféricos. Foram eles: *CTLA4*, *IL10*, *IL4*, *GATA3*, *FOXP3*, *TGFβ1*, *IFNγ*, *CXCR4*, *CD40* e *CD40L*. A escolha destes genes se deve ao fato de que nos permitem caracterizar o tipo de resposta imune que está ocorrendo no tecido. Além disso,

alguns desses genes foram analisados em estudo de associação de pênfigo foliáceo com alelos ou genótipos desses genes. Por fim, as suas funções, importantes para as respostas imunes, justificam a escolha desses genes como candidatos para o nosso estudo.

Existem 3 principais tipos de respostas de células T – Th1 (pró-inflamatória), Th2 (anti-inflamatória) e T reguladora (supressora) dependendo do padrão de citocinas por elas produzido. Existem muitas evidências de que subtipos de células T $CD4^+$, especializadas em suprimir respostas imunes, tem um papel central na regulação das respostas autoimunes. Estas células T reguladoras (Treg) são $CD4^+CD25^+$ têm a capacidade de suprimir ambas as respostas imunes dos tipos Th1 e Th2 e são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição FOXP3, sendo este necessário para seu desenvolvimento, manutenção e função. Entretanto, a expressão de FOXP3 não é suficiente para que a função reguladora destas células seja exercida.

Um dos mecanismos pelos quais as Treg exercem seu efeito supressor se dá através da secreção de TGFB e por IL10, citocina que inibe a síntese de citocinas pro-inflamatórias e a apresentação de antígenos para as células T. Muitos estudos demonstraram que a supressão de respostas Th2 é dependente de IL10 (por exemplo, HAWRYLOWICZ *et al.*, 2005). CTLA4 e TNFSF18 são expressos constitutivamente por células Treg. Na ausência de CTLA4 a função supressora de Treg é reduzida (ODERUP *et al.*, 2006). O papel de TNFSF18 ainda é contraditório. Há estudos mostrando sua atuação como supressor da inflamação (URAUSHIHARA *et al.*, 2003), bem como estudos mostrando sua ação como supressor de Treg (SHIMIZU *et al.*, 2002). Foi demonstrado que a ativação de TNFSF18 leva à reversão da atividade supressora das células Treg, induzindo células T efectoras a produzirem citocinas de perfil Th1 ou Th2. GATA3 é um fator de transcrição essencial para a polarização da resposta imune para um perfil Th2. IL4 é uma das citocinas característica de respostas com perfil Th2. Já o IFNG é uma citocina pro-inflamatória característica de respostas Th1. CXCR4 é um receptor de quimiocina expresso também sobre células Treg. As quimiocinas e seus receptores direcionam as células T periféricas para os sítios inflamatórios. JIAO *et al.* (2007) mostraram que há um acúmulo de células Treg no líquido sinovial em pacientes com artrite reumatóide e o recrutamento destas células é dependentes de vários receptores de quimiocinas expressos sobre as células Treg, incluindo CXCR4. A sinalização de CD40 pelo seu ligante, CD40L, entre células B e T é

imprescindível para a ativação da resposta imune humoral. CD40L é expresso em células T após sua ativação. CD40 sobre uma variedade de células, incluindo células B e queratinócitos. Já foi demonstrado que CD40/CD40L estão com expressão aumentada em lesões e soro de pacientes com pênfigo foliáceo e vulgar (CAPRONI *et al.*, 2007). Também a associação de certos genótipos desses genes com susceptibilidade ao pênfigo foliáceo constatada recentemente é um forte indício da participação dessas moléculas na resposta autoimune característica da doença.

No presente trabalho, foram encontrados níveis de expressão gênica mais elevada de *CTLA4*, *IL10*, *FOXP3*, *CXCR4* e *CD40L* no tecido lesionado em comparação ao não-lesionado (Figura 25). Já *TNFSF18* e *GATA3* estiveram mais expressos no tecido não-lesionado do que no lesionado. Estes dados sugerem fortemente que células Treg estão presentes nas lesões de pele de pacientes com pênfigo foliáceo indicando que elas contribuem para o controle local das funções das células T efetoras. Mais precisamente, *FOXP3* marca a presença de células Treg. *CTLA4* e *IL10* podem estar suprimindo as células Th2 efetoras. TGF β está presente, mas não há diferença de expressão entre os tecidos lesionado e não-lesionado. Sendo a resposta Th2 reprimida, *GATA3* tem sua expressão drasticamente diminuída. Provavelmente no pênfigo a função de *TNFSF18* é de suprimir células Treg, sendo que sua expressão também está diminuída no tecido lesionado. A expressão aumentada de *CXCR4* no tecido lesionado indica que este receptor é importante para a migração de células T para o sítio inflamatório. Expressão de *IL4* e *IFN γ* não foi detectada. Para o pênfigo vulgar foi demonstrado que camundongos *knockout* para IL10 são mais susceptíveis ao desenvolvimento de bolhas por transferência passiva de anticorpos anti-Dsg3, o que indica uma possível função supressora de IL10 (FELICIANI *et al.*, 2000). Também para o pênfigo vulgar, um possível papel de células Treg, foi demonstrado no qual os autores sugerem que um desbalanço entre células Treg e Th2 específicas para Dsg3 pode ser crítico para a perda de tolerância à Dsg3 nos pacientes com PV (VELDMAN *et al.*, 2008). Apesar de CAPRONI *et al.* (2001) demonstrarem a presença de células CD4⁺CD25⁺ na derme e epiderme lesionada de pacientes com pênfigo foliáceo, o presente trabalho é o primeiro a demonstrar um possível envolvimento e a sugerir um mecanismo pelo qual células Treg podem estar envolvidas no PF.

Não foi encontrada expressão diferencial de *CD40*. Para *CD40L* houve um pequeno aumento da sua expressão no tecido lesionado. Nosso grupo recentemente demonstrou que polimorfismos localizados nas regiões promotoras destes genes têm influência na patogênese do pênfigo foliáceo (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009 submetido para publicação). Num futuro próximo os genótipos dos pacientes envolvidos no presente estudo serão atribuídos para verificarmos se há uma expressão diferencial destes genes em consequência do genótipo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é o primeiro a investigar o perfil de expressão gênica diferencial em linfócitos de pacientes com pênfigo foliáceo. Mesmo outras formas de pênfigo ainda não foram analisadas para verificação de expressão gênica diferencial. Mais ainda, é a primeira vez que uma abordagem de larga escala é utilizada para investigar a patogênese de uma das formas clínicas de pênfigo. E para isto foram isoladas do sangue periférico de pacientes e controles populações extremamente puras de linfócitos T $CD4^+$ e seus perfis de expressão gênica foram avaliados com microarranjos. Foram feitas várias comparações entre subgrupos de pacientes, que permitiram, numa primeira análise, fazer várias constatações:

1. Foram identificados vários genes que possivelmente estão envolvidos na patogênese do pênfigo. Inicialmente destacam-se: genes envolvidos com citotoxicidade (*GZMA*, *GZMB*, *GZMH*, *GNLY*), adesão e migração celular (*CX3CR1*, *CD9*, *CD33*, *RAC1*, *GCA* e *FCGR1A*), apoptose e proliferação celular (*TNFSF9*, *TNFSF10*, *TNFSF13B*, *RAB31*, *IFI30*), apresentação de antígenos glicolipídicos (*CD1D*) e genes com função pouco conhecida (*NKG7*);
2. Genes que estiveram com expressão diminuída em pacientes sob tratamento e que podem ser alvos para terapias mais específicas incluem genes envolvidos com proliferação celular e apoptose (*TNFSF13B*, *CDA*, *BCL2A1*); adesão e migração de leucócitos (*ITGAX*, *FUT7* e *MMP19*) e apresentação de antígenos glicolipídicos (*CD1D*);

3. Mais que contribuir para o processo causal da doença, vários genes podem participar do curso e agravamento da mesma, estando com expressão aumentada na forma generalizada da doença e destacam-se as glectinas (*LGALS1* e *LGALS3*) e genes envolvidos com a apresentação de antígenos (*HLA-DMA* e *HLA-DMB*) e migração de linfócitos (*CD33*, *FUT7*, *ADAM9* e *ITGAM*);
4. Aproximadamente, 30% dos genes envolvidos na patogênese são compartilhados entre pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar, mostrando que estes dois fenótipos compartilham um mecanismo básico comum subjacente ao processo patogênico;
5. Genes característicos do envolvimento de células T reguladoras estiveram diferencialmente expressos entre os tecidos lesionado e não-lesionado de pacientes com pênfigo foliáceo, implicando a participação deste tipo celular no controle da doença.

As diferenças de expressão gênica descritas neste estudo são o resultado da expressão diferencial de genes na população total de células T CD4⁺. Estudos futuros permitirão elucidar se estes genes são preferencialmente expressos em subpopulações de células T CD4⁺, e de que formas contribuem para a patogênese do pênfigo.

Todos os genes aqui encontrados como diferencialmente expressos, são candidatos para futuros estudos de associação. A quase totalidade deles nunca havia sido indicada como um candidato em potencial a contribuir para a patogênese do pênfigo. O fato de muitos destes genes já terem sido encontrados como diferencialmente expressos em outras doenças autoimunes (Figuras 8-10) reforça ainda mais a possível implicação destes genes na modulação da patogênese da doença.

É a primeira vez que uma região genômica candidata a conter genes de susceptibilidade ao pênfigo foliáceo, que não o MHC em 6p21.3, é indicada – 19q13.

Ressalta-se que não foi esgotado o potencial dos resultados obtidos nesse trabalho, e que foram mostrados os resultados da análise inicial. A tecnologia de microarranjos permite identificar caminhos que podem estar envolvidos com o processo em estudo. Neste estudo vários fatos interessantes e inéditos foram encontrados e trabalhos futuros, com aplicação de outras metodologias (imunohistoquímica, dosagens séricas, entre outras) serão utilizados para corroborar estes achados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SHAHROUR F, DIAZ-URIARTE R, DOPAZO J. **Bioinformatics**; 20:578–580, 2004.
- AMAGAI M, HASHIMOTO T, GREEN KJ, SHIMIZU N, NISHIKAWA T. Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. **The Journal of Investigative Dermatology**; 104: 895-901, 1995b.
- AMAGAI M. Keratinocyte-keratinocyte interactions, cadherins and pemphigus. **Journal Investigative Dermatology**; 104:146-152, 1995a.
- ARREDONDO J, CHERNYAVSKY AI, KARAOUNI A, GRANDO SA. Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus. **Am J Pathol**; 167:1531-1544, 2005.
- BAECHLER EC, BATLIWALLA FM, KARYPIS G, GAFFNEY PM, ORTMANN WA, ESPE KJ, SHARK KB, GRANDE WJ, HUGHES KM, KAPUR V, GREGERSEN PK, BEHRENS TW. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 100(5):2610-5, 2003.
- BAIAO AMT, WOWK PF, SANDRIN-GARCIA P, JUNTA CM, FACHIN AL, MELLO SS, SAKAMOTO-HOJO ET, DONADI EA, PASSOS GAS. cDNA microarray analysis of cyclosporin a (csa)-treated human peripheral blood mononuclear cells reveal modulation of genes associated with apoptosis, cell-cycle regulation and dna repair. **Mol Cell Biochem**; 304:235–241, 2007.
- BARJAKTAREVIC I, RAHMAN A, RADOJA S, BOGUNOVIC B, VOLLMER A, VUKMANOVIC S, MARIC M. Inhibitory Role of IFN- γ -Inducible Lysosomal Thiol Reductase in T Cell Activation. **J Immunol**; 177: 4369–4375, 2006.
- BASTUJI-GARIN S, SOUISSI R, BLUM L, TURKI H, NOUIRA R, JOMAA B, ZAHAF A, BEM OSMAN A, MOKHTAR I, FAZAA B, et al. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. **J Invest Dermatol**; 104(2):302-5, 1995.
- BOMPRESZI R, RINGNER M, KIM S, BITTNER ML, KHAN J, CHEN Y, ELKAHLOUN A, YU A, BIELEKOVA B, MELTZER PS, MARTIN R, MCFARLAND HF, TRENT JM. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. **Hum Mol Genet**; 12(17):2191-9, 2003.
- BOWCOCK AM, SHANNON W, DU F, DUNCAN J, CAO K, AFTERGUT K, CATIER J, FERNANDEZ-VINA MA, MENTER A. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. **Hum Mol Genet**; 10(17):1793-805, 2001.
- BRAUN-PRADO, K and PETZL-ERLER, ML. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genet Mol Biol**; 30:314-321, 2007.
- BUZZA MS, ZAMURS L, SUN J, et al. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. **J Biol Chem**; 280:23549-23558, 2005.
- CAMPBELL I, REIS V, AOKI V *et al.* Pênfigo foliáceo endêmico/fogo selvagem. **Annual abras Dermatology**; 76(1):13-33, 2001.

- CANNONS JL, LAU P, GHUMMAN B *et al.* 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. **J Immunol**; 167:1313–24, 2001.
- CAPRONI M, ANTIGA E, TORCHIA D *et al.* The CD40/CD40 ligand system is involved in the pathogenesis of pemphigus. **Clin Immunol**; 124: 22-5, 2007.
- CAPRONI M, GIOMI B, CARDINALI C, SALVATORE E, PESTELLI E, D'AGATA A, BIANCHI B, TOTO P, FELICIANI C, FABBRI P. Further support for a role for Th2-like cytokines in blister formation of Pemphigus. **J Clin Immunol**; 98:264-271, 2001.
- CARIAPPA A, SHOHAM T, LIU H, LEVY S, BOUCHEIX C, PILLAI S. The CD9 Tetraspanin Is Not Required for the Development of Peripheral B Cells or for Humoral Immunity. **J Immunol**; 175:2925–2930, 2005.
- CARROLL JM, MCELWEE KJ, E KING L, BYRNE MC, SUNDBERG JP. Gene array profiling and immunomodulation studies define a cell-mediated immune response underlying the pathogenesis of alopecia areata in a mouse model and humans. **J Invest Dermatol**; 119(2):392-402, 2002.
- CERNA M, FERNANDEZ-VINA M, FRIEDMAN H, MORAES JR, MORAES ME, DIAZ L, STASTNY P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Xavante indians. **Tissue Antigens**; 42:138-140, 1993.
- CHANG CC, CIUBOTARIU R, MANAVALAN JS, YUAN J, COLOVAI AI, PIAZZA F, LEDERMAN S, COLONNA M, CORTESINI R, DALLA-FAVERA R, SUCIU-FOCA N. Tolerization of dendritic cells by t(s) cells: the Crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. **Nat Immunol**; 3:237–243, 2002.
- CHEEMA GS, ROSCHKE V, HILBERT DM, STOHL W. Elevated serum B lymphocyte stimulator level in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. **Arthritis and Rheumatism**; 44:1313-1319, 2001.
- CHIDGEY MAJ. Desmosomes and disease. **Histology and Histopathology**; 12:1159-1168, 1997.
- CROCKER PR. Siglecs in innate immunity. **Current Opinion in Pharmacology**; 5:431–437, 2005.
- DE MESSIAS IT, SANTAMARIA J, RAGIOTTO R, DOI EM, KAJDACS-BALLA A. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. **Clinics and Experimental Dermatology**; 14(1):51-5, 1989.
- DIAZ LA, SAMPAIO SAP, RIVITTI EA, MARTINS CR, CUNHA PR, LOMBARDI C, ALMEIDA FA, CASTRO RM, MACCA ML, LAVRADO C, HANS-FILHO G, BORGES P, CHAUL A, MINELLI L, EMPINOTTI JC, FRIEDMAN H, CAMPBELL I, LABIB RS, ANHALT GJ. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **J Invest Dermatol**; 92: 4-12, 1989.
- DUARTE N, STENSTROM M, CAMPINO S, BERGMAN ML, LUNDHOLM M, HOLMBERG D, CARDELL SL. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells. **J Immunol**; 173:3112–8, 2004.
- DUARTE N, STENSTROM M, CAMPINO S, BERGMAN ML, LUNDHOLM M, HOLMBERG D, CARDELL SL. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells. **J Immunol**; 173:3112–8, 2004.
- EXLEY M, GARCIA J, WILSON SB, SPADA F, GERDES D, TAHIR SM A, PATTON KT, BLUMBERG RS, PORCELLI S, CHOTT A, BALK SP. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. **Immunol**; 100 37–47, 2000.

- FELLOWS E, GIL-PARRADO S, JENNE DE, KURSCHUS FC. Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. **BLOOD**; 15 (110), 2007.
- GARIN A, TARANTINO N, FAURE S, DAOUDI M, LECUREUIL C, BOURDAIS A, DEBRE P, DETERRE P, COMBADIÈRE C. Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors. **J Immunol**; 171: 5305-5312, 2003.
- GONDEK DC, LU LF, QUEZADA SA, SAKAGUCHI S, NOELLE RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. **J Immunol**; 174:1783–1786, 2005.
- GRAN C, BOYUM A, JOHANSEN RF, LOVHAUG D, SEEBERG EC. Growth inhibition of granulocyte-macrophage colony-forming cells by human cytidine deaminase requires the catalytic function of the protein. **Blood**; 91:4127–4135, 1998.
- GROOM J, KALLED SL, CUTLER AH, OLSON C, WOODCOCK SA, SCHNEIDER P, TSCHOPP J, CACHERO TG, BATTEN M, WHEWAY J, MAURI D, CAVILL D, GORDON TP, MACKAY CR, MACKAY F. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**; 109:59-68, 2002.
- GROSSMAN WJ et al. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. **Blood**; 104:2840–2848, 2004.
- HANSEL NN, HILMER SC, GEORAS SN, COPE LM, GUO J, IRIZARRY RA, DIETTE G. Oligonucleotide-microarray analysis of peripheral-blood lymphocytes in severe asthma. **J Lab Clin Med**; 145:263-274, 2005.
- HANS-FILHO G, AOKI V, RIVITTI E, EATON DP, LIN MS, DIAZ L. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) - 1998. **Clinics in Dermatology**; 17:225-235, 1999.
- HAWRYLOWICZ CM, O’GARRA A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nature Rev Immunol**; 5: 271–283, 2005.
- HELLER RA, SCHENA M, CHAI A, SHALON D, BEDILION T, GILMORE J, WOOLLEY DE, DAVIS RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 94(6):2150-5, 1997.
- HIDALGO LG, EINECKE G, ALLANACHA K, HALLORANA PF. The Transcriptome of Human Cytotoxic T Cells: Similarities and Disparities Among Allostimulated CD4+ CTL, CD8+ CTL and NK cells. **American Journal of Transplantation**; 8:627–636, 2008.
- HIJNEN D, NIJHUIS E, BRUIN-WELLER M et al. Differential expression of genes involved in skin homing, proliferation and apoptosis in CD4+ T cells of patients with atopic dermatitis. **J Invest Dermatol**; 125:1149-1155, 2005.
- HURTADO JC, KIM YJ, KWON BS. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. **J Immunol**; 158:2600–9, 1997.
- IBRAHIM SM, GOLD R. Genomics, proteomics, metabolomics: what is in a word for multiple sclerosis? **Curr Opin Neurol**; 18(3):231-5, 2005.
- JANEWAY CA, TRAVERS P. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 2 ed., porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

- JARVIS JN, PETTY HR, TANG Y, FRANK MB, TESSIER PA et al. Evidence for chronic, peripheral activation of neutrophils in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**; 8: 1-14, 2006.
- JIAO Z, WANG W, JIA R, LI J, YOU H, CHEN L, WANG Y. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. **Scand J**
- KAPITEIN B, HOEKSTRA MO, NIJHUIS EHJ, HIJNEN DJ, ARETS HGM, KIMPEN JLL, KNOL EF. Gene expression in CD4+ T-cells reflects heterogeneity in infant wheezing phenotypes. **Eur Respir J**; 32: 1203–1212, 2008.
- KIM HY, KIM HJ, MIN HS, KIM S, PARK WS, PARK SH, CHUNG DH. NKT cells promote antibody-induced joint inflammation by suppressing transforming growth factor beta1 production. **J Exp Med**; 201:41–7, 2005.
- KÖHLER KF, PETZL-ERLER ML. No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Int J Immunogenet**;33(2):141-4, 2006.
- KUBY J. **Immunology**. 4 ed. New York: WH Freeman and Company, 2002.
- KURELLA M, HSIAO LL, YOSHIDA T, RANDALL JD, CHOW G, SARANG SS, JENSEN RV, GULLANS SR. DNA microarray analysis of complex biologic processes. **J Am Soc Nephrol**;12(5):1072-8, 2001.
- LAPRISE C, SLADEK R, PONTON A, BERNIER MC, HUDSON TJ, LAVIOLETTE M. Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. **BMC Genomics**; 5:21, 2004.
- LAVIE F, MICELI-RICHARD C, QUILLARD J, ROUX S, LECLERC P, MARIETTE X. Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. **J Pathol**; 202: 496–502, 2004.
- LI N, AOKI V, HANS-FILHO G, RIVITTI, DIAZ LA. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Experimental Medicine**; 197:1501-1510, 2003.
- LIEBERMAN J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nature Rev. Immunol.**; 3:361–370, 2003.
- LIN MS, FU CL, AOKI V, HANS-FILHO G, RIVITTI EA, MORAES JR, MORAES ME, LAZARO AM, GIUDICE GJ, STASTNY P, DIAZ LA. Characterization of desmoglein-1 epitopes recognized by T cells from patients with fogo selvagem. **Journal Investigative Dermatology**; 105:207-213, 2000.
- LIU F, SHINOMIYA H, KIRIKAE T, HIRATA H, ASANO Y. Characterization of murine grancalcin specifically expressed in leukocytes and its possible role in host defense against bacterial infection, **Biosci Biotechnol Biochem**; 68:894–902, 2004.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ddc_t} method. **Methods**; 25: 402–408, 2001.
- LOCK C, HERMANS G, PEDOTTI R et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. **Nat Med**; 8:500-508, 2002.
- LOISEAU P, LECLEACH L, PROST C, LEPAGE V, BUSSON M, BASTUJI-GARIN S, ROUJEAU JD, CHARRON D. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **Journal of Autoimmunity**; 15:67-73. 2000.

- LOMBARDI C, BOGES PC, CHAUL A, SAMPAIO SAP, RIVITTI HF, MARTINS CR, SANCHES JÁ, CUNHA PR, HOFFMANN RG DIAZ LA. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal Investigative Dermatology**; 98:847-850, 1992.
- MAAS K, CHAN S, PARKER J, SLATER A, MOORE J, OLSEN N, AUNE TM. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. **J Immunol**; 169(1):5-9, 2002.
- MAHONEY MG, WANG ZH, STANLEY JR. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. **Journal of Investigative Dermatology**; 113:22-25, 1999.
- MARTEL M, JOLY P. Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. **Clinics in Dermatology**; 19: 662-674, 2001a.
- MARTEL P, GILBERT D, DROUOT L, PROST C, RAUX G, DELAPORTE E, JOLY P, TRON F. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. **Genes and Immunity**; 2:41-43, 2001b.
- MEDLEY QG, KEDERSHA N, O'BRIEN S, TIAN Q, SCHLOSSMAN SF, STREULI M, ANDERSON P. Characterization of GMP-17, a granule membrane protein that moves to the plasma membrane of natural killer cells following target cell recognition. **Proc Natl Acad Sci USA**; 93:685-689, 1996.
- MIYAGAWA S, AMAGAI M, NIIZEKI H, YAMASHINA Y, KANESHIGE T, NISHIKAWA T, SHIRAI T, INOKO H. HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. **Tissue Antigens**; 54: 333-340, 1999.
- MORAES JR, MORAES ME, FERNANDEZ-VINA M. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**; 33:388-391, 1991.
- MORAES ME, FERNANDEZ-VINA M, LAZARO A, DIAZ A, FILHO GH, FRIEDMAN H, RIVITTI E, AOKI V, STASTNY P MORAES JR. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens**; 49:35-40, 1997.
- MOSER KL, GAFFNEY PM, GRANDITS ME, EMAMIAN ES, MACHADO DB, BAECHLER EC, RHODUS NL, BEHRENS TW. The use of microarrays to study autoimmunity. **J Investig Dermatol Symp Proc**; 9(1):18-22, 2004.
- NGUYEN VT *et al.* The pathofisiological significance of non-desmoglirin targets of pemphigus autoimmunity. Pemphigus vulgaris and foliaceus patients develop antibodies aganist keratinocyte cholinergic receptors. **Archives in. Dermatology**; 134:971-980, 1998.
- NIEMEYER M, DARMOISE A, MOLLENKOPF HJ, HAHNKE K, HURWITZ R, BESRA GS, SCHAIBLE UE, KAUFMANN SH E. Natural killer T-cell characterization through gene expression profiling: an account of versatility bridging T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses. **Immunol**; 123:45-56, 2007.
- ODERUP C, CEDERBOM L, MAKOWSKA A, CILIO CM, IVARS F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. **Immunol**; 118: 240-249, 2006.
- OLSSON B, RIDELL B, CARLSSON L, JACOBSSON S, WADENVIK H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. **BLOOD**; 112, 2008 .

- PATERSON RL, OR R, DOMENICO JM, DELESPESE G, GELFAND EW. Regulation of CD23 expression by IL-4 and corticosteroid in human B lymphocytes: altered response after EBV infection. **J Immunol**; 152:2139-47, 1994.
- PAVONI DP, CERQUEIRA LB, ROXO VM, PETZL-ERLER ML. Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Braz. J. Med. Biol. Res.**; **39**: 1227-32, 2006.
- PAVONI DP, ROXO VMMS, FILHO AM, PETZL-ERLER ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**; 4: 110-116, 2003.
- PENA SV, HANSON DA, CARR BA, GORALSKI TJ, KRENSKY AM. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. **J Immunol**; 158:2680–2688, 1997.
- PEREIRA E, TAMIA-FERREIRA MC, CARDOSO RS, MELLO SS, SAKAMOTO-HOJO ET, PASSOS GAS, DONADI EA. Immunossuppressive therapy modulates T lymphocyte gene expression in patients with systemic lúpus erythematosus. **Immunology**; 113:99-105, 2004.
- PEREIRA NF, HANSEN AJ, LIN MT, ROXO VMMS, BRAUN K, PETZEL-ERLER M. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**;28:233-241, 2003.
- PETZL-ERLER ML, MALHEIROS D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: Is there any relationship? **J Autoimmun**; 25:121-125, 2005.
- PETZL-ERLER ML, SANTAMARIA J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**; 33:408-414, 1989.
- PUVIANI M, MARCONI A, COZZANI E, PINCELLI C. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. **J Invest Dermatol**; 120:164–167, 2003.
- RABINOVICH GA, FT LIU, M. HIRASHIMA, ANDERSON A. An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**; 66:143–158, 2007.
- RAMANATHAN M, WEINSTOCK-GUTTMAN B, NGUYEN LT, BADGETT D, MILLER C, PATRICK K, BROWNSCHIEDLE C, JACOBS L. In vivo gene expression revealed by cDNA arrays: the pattern in relapsing-remitting multiple sclerosis patients compared with normal subjects. **J Neuroimmunol**; 116(2):213-9, 2001.
- REN X et al. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells. **Cell Death Differ**; 14:2076–2084, 2007.
- RIFAI A, DWORKIN LD. IgA nephropathy: markers of progression and clues to pathogenesis. **Kidney Int**; 73(12):1338-40, 2008.
- ROXO VM, PEREIRA NF, PAVONI DP, LIN MT, HANSEN JA, DE O POERSCH C, FILHO AM, PETZL-ERLER ML. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus--are there any associations? **Tissue Antigens**;62:394-400, 2003.
- RUS V, NGUYEN V, PULIAEV R, PULIAEVA IA, ZERNETKINA V, LUZINA I, PAPADIMITRIOU JC, VIA CS. T Cell TRAIL Promotes Murine Lupus by Sustaining Effector CD4 Th Cell Numbers and by Inhibiting CD8 CTL Activity. **J Immunol**; 178:3962–3972, 2007.

- RUS, V, ATAMAS SP, SHUSTOVA V, LUZINA IG, SELARU F, MAGDER LS, VIA CS. Expression of cytokine- and chemokine-related genes in peripheral blood mononuclear cells from lupus patients by cDNA array. **Clin Immunol**; 102: 283–290, 2002.
- SAEED AI, SHAROV V, WHITE J, LI J, LIANG W, BHAGABATI N, BRAISTED J, KLAPA M, CURRIER T, THIAGARAJAN M, STURN A, SNUFFIN M, REZANTSEV A, POPOV D, RYLTSOV A, KOSTUKOVICH E, BORISOVSKY I, LIU Z, VINSAVICH A, TRUSH V, QUACKENBUSH J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**; 34(2):374-8, 2003
- SANDILANDS GP, PERRY M, WOOTON M, HAIR J, MORE IA. B-cell antigens with normal and activated human T cells. **Immunol**; 96:424-433, 1999.
- SANTI CG, SOTTO MN. Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Am Acad Dermatol**; 44:446-50, 2001.
- SHIBATA Y, KAMATA T, KIMURA M et al. Ras activation in T cells determines the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation. **J Immunol**; 169:2134-2140, 2002.
- SHIMIZU J, YAMAZAK S, TAKAHASHI T, ISHIDA Y, SAKAGUCHI S. Stimulation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat Immunol**; 3:135, 2002.
- TANTISIRA KG, SILVERMAN ES, MARIANI TJ, XU J, RICHTER BG, KLANDERMAN BJ, LITONJUA AA, LAZARUS R, ROSENWASSER LJ, FCER AL: A pharmacogenetic basis for severe exacerbations in children with asthma. **J Allergy Clin Immunol**; 120:1285-91, 2007.
- TODD JA. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. **BioEssays**; 21:164-174, 1999.
- TOMPKINS SM, MILLER SD. An array of possibilities for multiple sclerosis. **Nat Med**; 8(5):451-3, 2002.
- TORSTEINSDOTTIR I, HAKANSSON L, HALLGREN R et al. Serum lysozyme: a potential marker of monocyte/macrophage activity in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**; 38:1249-1254, 1999.
- URAUSHIHARA K, KANAI T, KO K, TOTSUKA T, MAKITA S, IIYAMA R, NAKAMURA T, WATANABE M. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25⁺ and CD25⁺ CD4⁺ glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene⁺ regulatory T cells. **J Immunol**; 171:708, 2003.
- van der POUW KRAAN TC, van GAALEN FA, HUIZINGA TW, PIETERMAN E, BREEDVELD FC, VERWEIJ CL. Discovery of distinctive gene expression profiles in rheumatoid synovium using cDNA microarray technology: evidence for the existence of multiple pathways of tissue destruction and repair. **Genes Immun**; 4(3):187-96, 2003.
- VELDMAN C, HOHNE A, DIECKMANN D, SCHULER G, HERTL M. Type I Regulatory T Cells Specific for Desmoglein 3 Are More Frequently Detected in Healthy Individuals than in Patients with Pemphigus Vulgaris. **The Journal of Immunology**, 172: 6468–6475, 2004.
- WANG X, BREGEGERE F, FRUSIC-ZLOTKIN M, FEINMESSER M, MICHEL B, MILNER Y. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. **Apoptosis** 9: 131–143, 2004.
- WARREN SJP, LIN MS, GIUDICE GJ, HOFFMANN RG, HANS-FILHO G, AOKI V, RIVITTI EA, SANTOS V, DIAZ LA. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **The New England Journal of Medicine**; 343: 23-30, 2000.

- WHEELER GN, PARKER AE, THOMAS CL, ATALIOTIS P, POYNTER D, ARNEMANN J, RUTMAN AJ. Desmosomal glycoprotein DGI, a component of intercellular desmosome junctions, is related to the cadherin family of cell adhesion molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 88:4796-4800, 1991.
- WOLF R, MATZ H, RUOCCO E, RUOCCO V. The putative role of apoptosis in the induction of pemphigus. **Med Hypotheses**; 64(1):44-5, 2005.
- WUCHERPFENNIG KW, STROMINGER JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. **Cell**; 80:695-705, 1995.
- XUE W, HASHIMOTO K, TOIY. Functional involvement of urokinase-type plasminogen activator receptor in pemphigus acantolysis. **Journal of Cutaneous Pathology**; 25:469-474, 1998.
- YANG RY, Hsu DK, Yu L, Ni J, Liu FT. Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. **J Biol Chem**; 276:20252-60, 2001.
- ZHANG J, ROSCHKE V, BAKER KP, WANG Z, ALARCÓN GS, FESSLER BJ, BASTIAN H, KIMBERLY RP, ZHOU T. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. **The Journal of Immunology**; 166:6-10, 2001.
- ZUCOLOTTO I, ROSELINO AM, RAMALHO LN, ZUCOLOTTO S. Apoptosis and p63 expression in the pathogenesis of bullous lesions of endemic pemphigus foliaceus. **Arch Dermatol Res**; 295: 284-286, 2003.

ANEXO

Anexo1. Genes induzidos e reprimidos em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com pênfigo vulgar em relação aos linfócitos de indivíduos controle

Acesso ¹	Gene	Descrição	Diferença de expressão ²	Lócus
NM_014358	CLECSF9	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 9	4.9	12p13.31
NM_000566	CD64	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (FCGR1A)	4.8	1q21.2
NM_021034	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	4.5	11p15.5
NM_001766	CD1D	CD1D antigen, d polypeptide	4.4	1q22
NM_000407	GP1BB	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	4.2	22q11.21
NM_181526	MYL9	myosin, light polypeptide 9, regulatory, transcript variant 2	4.1	20q11.23
NM_007283	MGLL	monoglyceride lipase	3.8	3q21.3
NM_006868	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family	3.7	18p11.3
NM_002619	PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)	3.6	4q12
NM_005231	CTTN	cortactin, transcript variant 1	3.5	11q13
BU753776	TREML1	UI-1-BB1p-akk-b-06-0-UIs1 NCI_CGAP_P16 cDNA clone UI-1-BB1p-akk-b-06-0-UI 3'	3.4	6p21.1
NM_012445	SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	3.2	4p16.3
NM_002619	PF4	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)	3.2	4q12
NM_006834	RAB32	RAB32, member RAS oncogene family	3.1	6q24.3
NM_003246	THBS1	thrombospondin 1	3.0	15q15
NM_014836	RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1, transcript variant 1	3.0	10q21.2
NM_006176	NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	3.0	11q24
NM_020980	AQP9	aquaporin 9	2.9	15q22.1
NM_001337	CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	2.9	3p21.3
NM_006332	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	2.9	19p13.1
NM_005211	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog	2.9	5q33
NM_005213	CSTA	cystatin A (stefin A)	2.8	3q21
NM_002262	KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1, transcript variant 1	2.7	12p13
NM_002704	PPBP	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	2.7	4q12
NM_138296	PTCRA	pre T-cell antigen receptor alpha	2.6	6p21.3

NM_004106	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	2.6	1q23
NM_005980	S100P	S100 calcium binding protein P	2.5	4p16
NM_138961	ESAM	endothelial cell adhesion molecule	2.5	11q24.2
NM_002558	P2RX1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	2.5	17p13.3
NM_033423	GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	2.4	14q11.2
NM_006006	ZNF145	zinc finger protein 145 (Kruppel-like, expressed in promyelocytic leukemia)	2.4	11q23.1
NM_139075	TPCN2	two pore segment channel 2	2.4	11q13.2
NM_004287	GOSR2	golgi SNAP receptor complex member 2, transcript variant A	2.4	17q21
NM_001769	CD9	CD9 antigen (p24)	2.4	12p13.3
NM_012483	GNLY	granulysin, transcript variant 519	2.3	2p11.2
NM_012387	PADI4	peptidyl arginine deiminase, type IV	2.3	1p36.13
NM_000174	GP9	glycoprotein IX (platelet)	2.3	3q21.3
NM_031469	SH3BGRL2	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	2.3	6q13
NM_000387	SLC25A20	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20, nuclear gene encoding mitochondrial protein	2.2	3p21.31
NM_020944	GBA2	glucosidase, beta (bile acid) 2	2.2	9p13.3
NM_012329	MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated	2.2	17q
NM_033123	PLCZ1	phospholipase C, zeta 1	2.2	12p12.3
NM_000076	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	2.1	11p15.5
NM_080593	HIST1H2BK	histone 1, H2bk	2.1	6p21.33
NM_003739	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	2.0	10p15
NM_006667	PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1	2.0	Xq22
NM_016428	ABI3	ABI gene family, member 3	2.0	17q21.3
NM_201625	MICL	myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor, transcript variant 3	2.0	12p13.2
NM_004131	GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	2.0	14q11.2
NM_005601	NKG7	natural killer cell group 7 sequence, mRNA	1.9	19q13.33
NM_001359	DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein	1.9	8q21.3
NM_018438	FBXO6	F-box protein 6, mRNA	1.9	1p36.22
NM_003661	APOL1	apolipoprotein L, 1, transcript variant 1	1.9	22q13.1
AA010611	TFDP1	zi09f09.s1 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1 cDNA clone IMAGE:430313 3'	1.8	13q34
NM_006907	PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1, transcript variant 1	1.8	17q25.3
NM_000507	FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase 1	1.8	9q22.3

NM_018180	DHX32	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 32	1.7	10q26.2
NM_003650	CST7	cystatin F (leukocystatin)	1.7	20p11.21
NM_032857	LACTB	lactamase, beta (LACTB), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	1.7	15q22.1
NM_021706	LAIR1	leukocyte-associated Ig-like receptor 1, transcript variant b	1.7	19q13.4
NM_032782	HAVCR2	hepatitis A virus cellular receptor 2, mRNA	1.7	5q33.3
NM_018003	UACA	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	1.6	15q22
NM_013956	NRG1	neuregulin 1, transcript variant HRG-beta1	1.6	8p12
NM_021246	LY6G6D	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D	1.6	6p21.3
NM_207035	NPD014	NPD014 protein, transcript variant 1	1.6	1p36.13
NM_001911	CTSG	cathepsin G	1.6	14q11.2
NM_000574	DAF	decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	1.6	1q32
NM_000169	GLA	galactosidase, alpha	1.6	Xq22
NM_032801	JAM3	junctional adhesion molecule 3	1.6	11q25
NM_181777	UBE2A	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog), transcript variant 3	1.6	Xq24
NM_138460	CKLF5F5	chemokine-like factor super family 5, transcript variant 1	1.6	14q11.2
NM_019602	BTNL2	butyrophilin-like 2 (MHC class II associated), mRNA	1.6	6p21.3
NM_001230	CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine protease, transcript variant A	1.5	2q33
NM_000991	RPL28	ribosomal protein L28	1.5	19q13.4
NM_003821	RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	1.5	8q21
NM_145243	MPRP-1	metalloprotease related protein 1	1.5	1p32.1
NM_007351	MMRN1	multimerin 1	1.5	4q22
NM_013332	HIG2	hypoxia-inducible protein 2	1.5	7q32.1
NM_005717	ARPC5	actin related protein 2/3 complex, subunit 5, 16kDa	1.5	1q25.3
NM_006759	UGP2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2, transcript variant 1	1.5	2p14
NM_004760	STK17A	serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	1.5	7p12
NM_003760	EIF4G3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	1.5	1p36.12
NM_178230	COAS2	cyclophilin-LC	1.5	1q21.1
NM_025202	EFHD1	EF hand domain containing 1	1.5	2q37.1
NM_002745	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1, transcript variant 1	1.5	22q11.21
NM_005127	CLECSF2	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 2 (activation-induced)	1.5	12p13
NM_015378	VPS13D	vacuolar protein sorting 13D (yeast)	-1.5	1p36.22

NM_003688	CASK	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	-1.5	Xp11.4
NM_012337	NESG1	nasopharyngeal epithelium specific protein 1	-1.6	1q22
NM_000878	IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	-1.6	22q13.1
NM_033514	LIMS3	LIM and senescent cell antigen-like domains 3	-1.6	2q14
NM_031200	CCR9	chemokine (C-C motif) receptor 9, transcript variant A	-1.7	3p21.3
NM_016285	KLF12	Kruppel-like factor 12, transcript variant 2	-1.8	13q22
NM_006203	PDE4D	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (phosphodiesterase E3 dunce homolog, Drosophila)	-1.9	5q12
NM_000073	CD3G	CD3G antigen, gamma polypeptide (TiT3 complex)	-1.9	11q23
NM_003031	SIAH1	seven in absentia homolog 1 (Drosophila)	-2.0	16q12
NM_002569	FURIN	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)	-2.5	15q26.1

¹ Indica o número de acesso ao Gene Bank; ² Diferença de expressão. O sinal negativo indica os genes reprimidos; ³ Localização cromossômica.